

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Daut
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**

Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem Kaliumkanal TREK-1 und Hämoxxygenasen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Vivien-Isabell Kocher
geb. Lauer
aus Gronau/ Leine

Marburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
24.08.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Rothmund
Referent:	PD Dr. Preisig-Müller
Korreferent:	Prof. Dr. Frankenberger

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Daut
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**

Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem Kaliumkanal TREK-1 und Hämoxygenasen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Vivien-Isabell Kocher
geb. Lauer
aus Gronau/ Leine

Marburg 2012

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Kaliumkanäle.....	1
1.2 Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K _{2P})	2
1.3 TREK-1.....	5
1.3.1 Regulation von TREK-1	6
1.3.2 Die physiologische Rolle von TREK-1	11
1.4 Hämoxygenase-2 – ein neuer Interaktionspartner von TREK-1	12
1.4.1 Das Substrat der Hämoxygenase - das Häm	13
1.4.2 Die Aufgaben der Hämoxygenase und ihre Produkte	13
1.4.3 Biliverdin und Bilirubin	14
1.4.4 Eisen	15
1.4.5 Kohlenmonoxid.....	15
1.5 Die Hämoxygenase-Isoenzyme.....	17
1.5.1 Die Hämoxygenase-2	18
1.5.2 Die Hämoxygenase-1	19
1.6 Fragestellung.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Chemikalien und Lösungen	22
2.1.2 Ausrüstung	23
2.2 Methoden	28
2.2.1 Molekularbiologie	28
2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	28
2.2.1.2 Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA.....	28
2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA: Minipräparation	29
2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA: Midipräparation	29
2.2.1.5 DNA- / RNA- Konzentrationsbestimmung.....	29
2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese.....	30
2.2.1.7 DNA-Sequenzierung.....	31
2.2.1.8 Ortsgerichtete Mutagenese	31
2.2.1.9 Reverse Transkription	33
2.2.1.10 RT-PCR zur Vervielfältigung spezifischer Genabschnitte.....	33
2.2.1.11 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen und DNA-Ligation ..	35
2.2.1.12 <i>In vitro</i> -Transkription.....	36

2.2.2 Elektrophysiologie	37
2.2.2.1 cRNA-Injektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	37
2.2.2.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	38
2.2.2.3 Statistik	39
2.2.3 Zellkultur	40
2.2.3.1 Splitten von Zellkulturen	40
2.2.3.2 Transiente Transfektion von Zellkulturen	41
2.2.4 Proteinbiochemie	41
2.2.4.1 Proteinisolierung aus HeLa-Zellen	41
2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.2.4.3 Westernblot nach der Fluoreszenz-Methode	44
2.2.5 Hefe-Zwei-Hybrid-System	46
2.2.5.1 Hefe-Transformation	47
2.2.5.2 Hefe-Spotting	49
2.2.5.3 X-Gal Assay	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Direkte Interaktion von hTREK-1c und anderen K_{2P} -Kanälen mit Hämoxygenase-1 und Hämoxygenase-2 im Hefe-zwei-Hybrid-System ..	50
3.1.1 Untersuchung der Interaktionen von hTREK-1 Spleißvarianten mit HO-1 und HO-2	51
3.1.2 Untersuchung d. Interaktion weiterer K_{2P} -Kanäle m. HO-1&HO-2 ..	52
3.1.3 Direkte Interaktion des Kir2.1 mit HO-1 und HO-2	54
3.2 Strommessungen von hTREK-1c unter dem Einfluss von HO-1 und HO-2 in Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	55
3.3 Aminoterminal Fusion eines Hämagglutinin-Epitops mit hTREK-1c	58
3.4 Carboxyterminale Fusion des Proteins EGFP mit hTREK-1c	60
4. Diskussion	62
4.1 Untersuchung der Interaktion von HO-1 und HO-2 mit K_{2P} -Kanälen .	62
4.1.1 Direkte Interaktion von Hämoxygenasen mit K_{2P} -Kanälen	62
4.1.2 Untersuchung zur funktionellen Interaktion zwischen TREK-1c und den Isoformen HO-1 und HO-2	64
4.2 Fusion des Hämagglutinin (HA)-Epitops und des EGFP-Proteins mit hTREK-1c	65
4.3 Ausblick	67
5. Zusammenfassung	69
6. Summary	71

7. Anhang	VI
7.1 Literaturverzeichnis	VI
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	XII
7.3 Tabellenverzeichnis:.....	XII
7.4 Vektorkarten	XIII
7.5 Tabellarischer Lebenslauf	XV
7.6 Verzeichnis akademischer Lehrer	XVI
7.7 Danksagung	XVII

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AKAP150	PKA-Ankerprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Biliverdin
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	komplementäre RNA
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA≙DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
Fe ²⁺	Eisen II
Fe ³⁺	Eisen III
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hämagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure Natriumsalz
HO	Hämoxygenase
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
HO-3	Hämoxygenase-3
HRM	hämregulatorische Motive
HSP-32	Hitzeschockprotein-32
IL-10	Interleukin-10

IL-1 β	Interleukin-1 β
K ⁺	Kaliumion
K _{2P} -Kanal	Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
LiOAc	Lithiumacetat
–LW	ohne Leucin und Tryptophan
–LWHA	ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin
M	Molar
MAP2	Mikrotubuli-assoziierte Protein 2
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n	Menge
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
P	porenbildende Region
p38 MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Englisch: Polymerase Chain Reaction
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PrP ^C	Prion Protein
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Englisch: Real time-PCR
RT-Puffer	Reverse-Transkriptionspuffer
SD	Englisch: „syntheticdropout“ (Minimalmedium für Hefen)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	so genannt
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
TM	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V _{max}	maximale Geschwindigkeit
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YPD	Englisch: “Yeast Proteome Database” (Hefemedium)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Zelle als kleinste lebende Einheit ist von einer Plasmamembran umgeben, die den Extra- vom Intrazellularraum trennt. Durch ihre Hydrophobizität stellt sie eine kaum überwindbare Barriere für hydrophile Moleküle und Ionen dar. Nur sehr kleine Moleküle, wie Gase und größere lipidlösliche Stoffe, sind in der Lage die Plasmamembran mittels Diffusion zu überwinden. Neben Lipiden enthält die Membran auch Proteine. Diese sorgen als integrale Proteine, die sich durch die gesamte Membran spannen, für die Kommunikation zwischen Intra- und Extrazellularraum. Zu dieser Art Transportproteine zählen z. B. Ionenpumpen, Carrierproteine und Ionenkanäle (Klinke, 2009).

1.1 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle ermöglichen den spezifischen Durchtritt von K^+ -Ionen durch die Plasmamembran und stellen die häufigste und heterogenste Gruppe aller bekannten Ionenkanäle dar. Sie werden sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die intrazelluläre Kaliumionenkonzentration um das 40-fache höher als die extrazelluläre. Das Ruhemembranpotential ist dabei im Wesentlichen vom transmembranalen K^+ -Konzentrationsgradienten abhängig. Kaliumkanälen kommen vielfältige Aufgaben zu: Sie sind z. B. beteiligt an der Regulation der neuronalen und muskulären Erregbarkeit, der Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen, der Regulation des Zellvolumens sowie der Regulation der Kaliumhomöostase, um nur die Wichtigsten zu nennen (Lesage & Lazdunski, 2000). Ein funktioneller Kaliumkanal kann sich aus mehreren gleichen oder verschiedenen α -Untereinheiten formieren, wobei je nach Zusammensetzung homo- oder heterooligomere Kaliumkanäle entstehen. Abhängig von der Gruppenzugehörigkeit des Kaliumkanals ist dieser aus zwei oder vier α -Untereinheiten aufgebaut. Bisher wurden drei große Gruppen von Kaliumkanälen klassifiziert, deren α -Untereinheiten sich in der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TM) unterscheiden (Choe, 2002).

Die α -Untereinheiten der spannungs- und ligandengesteuerten Kaliumkanäle (Kv; Abb. 1.1, a) haben typischerweise sechs TM (S1-S6) und eine porenbildende Region (P). α -Untereinheiten der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle (Kir; Abb. 1.1, b) haben hingegen typischerweise nur zwei TM und eine P. Funktionelle Kv- und Kir-Kanäle sind jeweils aus vier α -Untereinheiten aufgebaut, wobei sich die für Kaliumionen selektive Pore aus den vier porenbildenden Regionen formiert (Doyle et al., 1998). Weitere Proteine können mit den α -Untereinheiten assoziiert sein, die dann akzessorische oder β -Untereinheiten genannt werden und die Kaliumkanaleigenschaften maßgeblich verändern können.

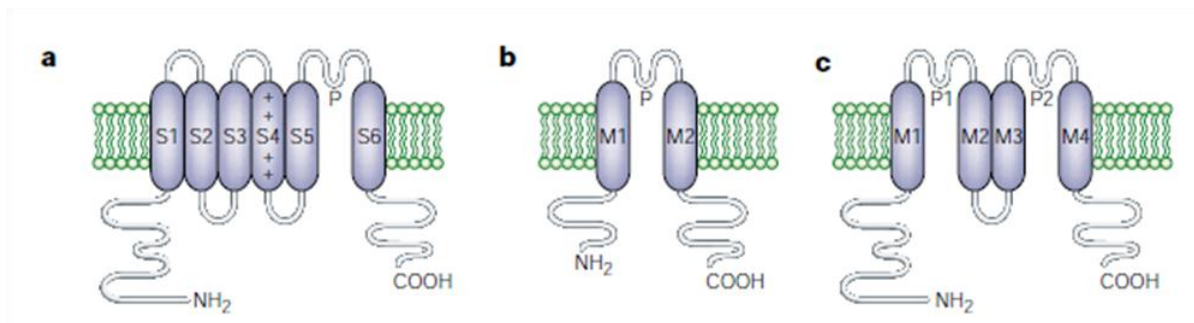


Abb.1.1 Übersicht über die drei Hauptklassen der Kaliumkanäle.

a Membrantopologie einer α -Untereinheit eines spannungs- und ligandengesteuerten Kanals (Kv). S1-S6 zeigt die Position der Transmembrandomänen und P die Lage der Porenregion.

b Membrantopologie der α -Untereinheit eines einwärtsgerichteten Kaliumkanals (Kir). M1-M2 zeigt die Position der Transmembrandomänen und P die Lage der Porenregion.

c Membrantopologie der α -Untereinheit eines K_{2P} -Kanals. M1-M4 zeigt die Position der Transmembrandomänen und P1 und P2 die Lage der Porenregionen.

Bei allen hier dargestellten Kaliumkanälen sind die Aminotermini und der Carboxytermini intrazellulär lokalisiert.

[aus (Goldstein, Bockenhauer, O'Kelly, & Zilberberg, 2001)]

1.2 Zwei-Poren-Domänen Kaliumkanäle (K_{2P})

Die α -Untereinheiten der K_{2P} -Kanäle sind durch ihren Aufbau aus vier TM, zwei porenbildenden Domänen, einem Verbindungsstück zwischen zweiter und dritter TM, sowie durch einen zytosolisch lokalisierten Amino- und Carboxyterminus gekennzeichnet (Abb. 1.1, c). Der im Zytosol lokalisierte carboxyterminale Bereich ist länger als der aminoterminal Bereich und besitzt verschiedene Bindungsstellen für Interaktionspartner. Des Weiteren finden sich im carboxyterminalen Bereich der α -Untereinheiten Sequenzmotive für

posttranslationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung, durch die die Funktion eines K_{2P} -Kanals reguliert werden kann und damit auch seine Wirkung auf die Physiologie einer Zelle (Patel & Honore, 2001; Rajan et al., 2002). Um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden, lagern sich zwei α -Untereinheiten zusammen. Im Unterschied zu den Kv- und Kir-Kanälen liegen die K_{2P} -Kanäle als Dimere vor. Die beiden porenbildenden Domänen sind aus kurzen Aminosäuresequenzen aufgebaut. Sie senken sich in die Membran ein, jedoch ohne sie zu durchqueren. Hier ist der Selektivitätsfilter für Kaliumionen mit der Aminosäuresequenz G-[Y/F/L]-G lokalisiert (Doyle et al., 1998).

Die Gruppe der K_{2P} -Kanäle ist die jüngste der bisher erforschten Kaliumkanäle der Säugetiere. Nach ersten Entdeckungen von K_{2P} -Kanälen in der Hefe und in der Fruchtfliege, wurden sie in Säugetieren erstmals von der Gruppe um Michel Lazdunski im Jahre 1996 beschrieben (Fink et al., 1996). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden 15 K_{2P} -Kanäle kloniert. Diese werden nach ihren funktionellen und strukturellen Eigenschaften wiederum in sechs Untergruppen eingeteilt (siehe Abb.1.2). In der porenbildenden Region besteht die größte strukturelle Homologie zwischen den einzelnen Unterfamilien. Die erste Untergruppe wird von den mechanosensitiven K_{2P} -Kanälen TRAAK, TREK-1 und TREK-2 (TREK-Familie) gebildet. Die zweite Gruppe, gebildet durch TALK-1, TALK-2 und TASK-2, zeichnet sich durch ihre Aktivität bei alkalischem pH-Wert aus (TALK-Familie). TREK-1 bildet als einziger Kanal die Gruppe drei und ist durch Calciumionen aktivierbar. TWIK-1, TWIK-2 und KCNK-7 bilden als schwache Einwärtsgleichrichter die vierte Gruppe. Die fünfte Gruppe besteht aus den säuresensitiven Kanälen TASK-1, TASK-3 und TASK-5, wobei TASK-5 bisher nicht funktionell exprimiert werden konnte. THIK-1 und THIK-2 bilden die letzte Untergruppe und werden typischerweise durch Halothan, einen halogenierten Kohlenwasserstoff, der auch als Inhalationsanästhetikum verwendet wird, inhibiert (Medhurst et al., 2001).

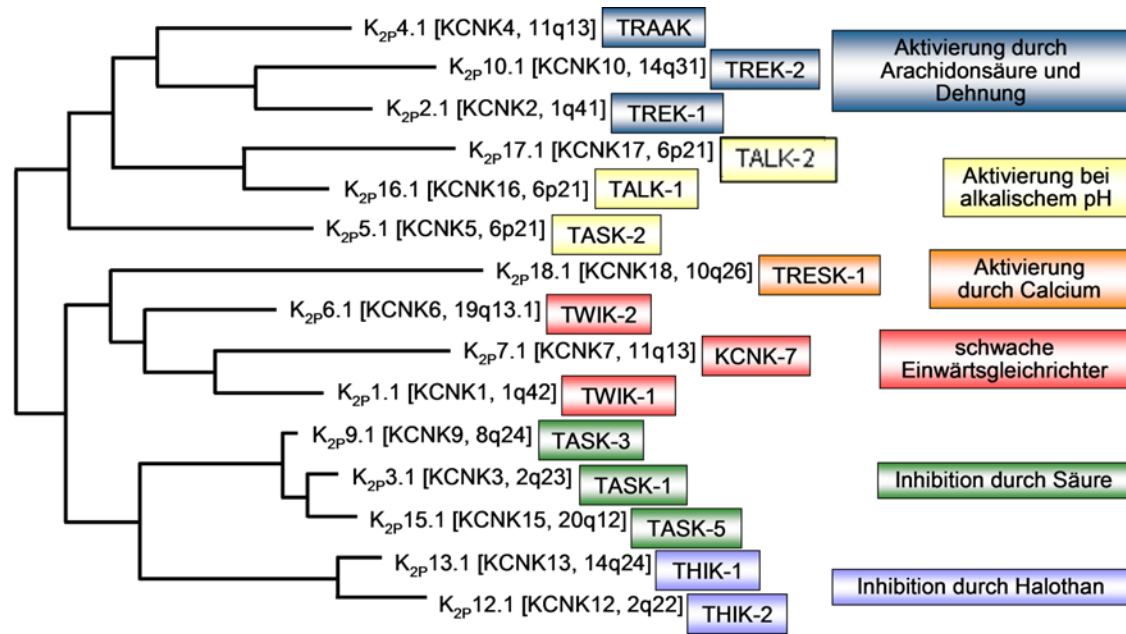


Abb. 1.2 Phylogenetischer Stammbaum der humanen K_{2P} -Kanäle.

Dargestellt sind die Nomenklatur, chromosomale Lokalisation und funktionellen Charakteristika der K_{2P} -Kanäle. Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften lassen sich die K_{2P} -Kanäle in sechs Untergruppen einteilen. [modifiziert nach (Honore, 2007)]

Die K_{2P} -Kanäle sind in nahezu allen Geweben sowohl in erregbaren als auch in nicht erregbaren Zellen exprimiert und können in bestimmten Kombinationen funktionelle Kaliumkanäle bilden (Lesage, 2003). Alle oben genannten Mitglieder der K_{2P} -Kanäle werden häufig als sogenannte Leck- oder Hintergrundkanäle bezeichnet, die sich wie kaliumselektive Löcher in einem elektrischen Feld verhalten. Die von ihnen produzierten Ströme sind zeit- und spannungsunabhängig, nicht durch die üblichen Kaliumkanalblocker blockierbar und bei allen Membranpotentialen aktiv. Bei einer physiologischen Kaliumionenkonzentration (intrazellulär hohe K^+ -Konzentration, extrazellulär geringe K^+ -Konzentration) ist ein stark nach außen rektifizierender Strom messbar (Lesage & Lazdunski, 2000). Der K_{2P} -Kanal TREK-1 ist jedoch nicht stets offen, sondern durch diverse physikalische und chemische Stimuli sehr genau in seiner Aktivität reguliert. Temperatur, mechanische Dehnung, pH-Wert, Neurotransmitter sowie Sauerstoffpartialdruck sind dabei mögliche Reize für den Kanal (Fink et al., 1996; Honore, Maingret, Lazdunski, & Patel, 2002). Im aktiven Zustand des TREK-1 wird das Ruhemembranpotential und somit die gesamte Zelle durch Ausstrom von K^+ -Ionen stabilisiert.

1.3 TREK-1

TREK-1 (**TWIK-related K^+ -Channel-1**) als Mitglied der ersten Untergruppe der K_{2P} -Kanäle (mechanosensitiv) ist der bisher am besten untersuchte Kanal aus der Gruppe der K_{2P} -Kanäle. Er zeichnet sich durch eine Reihe von besonderen Eigenschaften aus. Während die anderen Kanäle dieser Gruppe (TRAAK und TREK-2) keine Zeit- und Spannungsabhängigkeit zeigen, ist TREK-1 von diesen beiden Faktoren bei Depolarisation beeinflussbar. Außerdem ist anstelle einer linearen Strom-Spannungsbeziehung, wie sie durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung vorhergesagt wird, bei symmetrischen Kaliumionenkonzentrationen eine starke Auswärts-Gleichrichtung zu beobachten. Die Hemmung des Einwärtsstromes bei negativen Membranpotentialen wird vermutlich durch einen externen Mg^{2+} -Block verursacht. Zudem wird ein intrinsischer spannungsabhängiger Mechanismus beschrieben (Bockenhauer, Zilberberg, & Goldstein, 2001). TREK-1 induziert Hintergrundströme, die die Erregbarkeit in der Zelle regulieren. Im Gehirn und zentralen Nervensystem ist die Expression von TREK-1 besonders stark. Hier wird er vor allem im Hippocampus, Hypothalamus, im präfrontalen Kortex, Kleinhirn und im Bulbus olfactorius exprimiert. Er wird jedoch auch in peripheren Geweben stark exprimiert. Dazu gehören das Myometrium der Gebärmutter, Eierstöcke, Niere, Magen, Dünndarm, Herz und die Skelettmuskulatur (Bai et al., 2005; Fink et al., 1996; Medhurst et al., 2001).

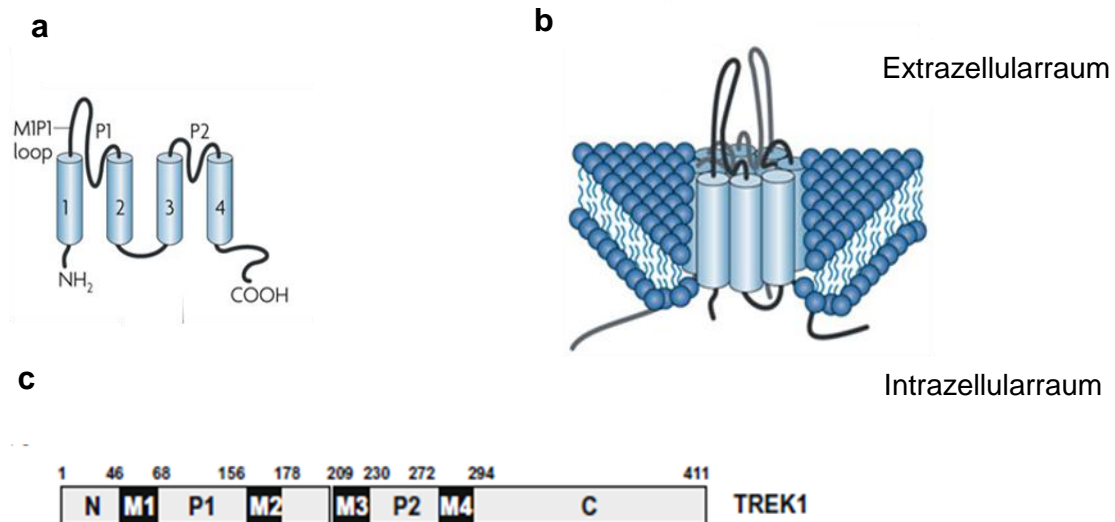


Abb. 1.3 Schematische Darstellung von TREK-1.

a Struktur einer α-Untereinheit von TREK-1. P1 und P2 zeigen die Porenregionen des Kanals. 1-4 stellen die Transmembrandomänen dar.

b Die dimere Struktur der beiden α-Untereinheiten eingebettet in die Plasmamembran.

c Strukturelle Regionen von TREK-1. Die Zahlen beschreiben die Positionen der Aminosäuren und damit die Längen der einzelnen kodierenden Abschnitte. M1-4 stellen die Transmembrandomänen dar. [modifiziert nach (Honore, 2007) und (Kim, et al., 2010)]

1.3.1 Regulation von TREK-1

Auf den K₂P-Kanal TREK-1 wirkt permanent eine große Anzahl an Reizen ein. Dazu gehören neben physikalischen und chemischen Reizen auch pharmakologische Substanzen (siehe Abb.1.4). Zum Beispiel wird der Kanal durch Zunahme des Zellvolumens und der damit einhergehenden Membrandehnung aktiviert. Im Gegensatz dazu führt eine konkave Verformung der Plasmamembran durch Flüssigkeitsverlust zu einer Inhibition des TREK-1 (Patel et al., 1998). Eine weitere Aktivierung des Kanals geht von der Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes aus. Die intrazelluläre Azidose macht aus dem mechanosensitiven Kanal einen ständig geöffneten Leck-Kanal. Die Aminosäure Glutamat an Position 306 fungiert dabei als Protonensensor. Eine Substitution der Aminosäure Glutamat 306 durch die Aminosäure Alanin hebt die negative Ladung des Glutamatrests auf und imitiert eine intrazelluläre Azidose, die den TREK-1 in einen ständig offenen Kanal überführt (Honore et al., 2002). Auch Temperaturerhöhung steigert die

Aktivität von TREK-1. Im Bereich zwischen 32 °C und 37 °C liegt seine maximale Sensitivität. Die Stromamplitude erhöht sich in diesem Bereich kontinuierlich pro Grad Celsius (Maingret et al., 2000).

In der Literatur wird die Sauerstoffsensitivität des TREK-1 unter hypoxischen Bedingungen kontrovers diskutiert. In der Ratte konnte allerdings die Expression des TREK-1 im Glomus caroticum, der zu den peripheren Chemosensoren gehört und den Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid Partialdruck sowie den pH-Wert des Blutes misst, nachgewiesen werden (Yamamoto & Taniguchi, 2006). Hypoxie scheint einen inhibierenden Effekt auf den TREK-1 zu haben. Sicher nachgewiesen ist jedoch der neuroprotektive Effekt des TREK-1 bei Ischämie im Gehirn und des damit einhergehenden Sauerstoffmangels (Buckler & Honore, 2005; Caley, Gruss & Franks, 2005; Franks & Honore, 2004; Miller, Kemp & Peers, 2005). Außerdem wird der Kanal von unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen beeinflusst. Wie jüngste Studien zeigen, soll TREK-1 in diesem Zusammenhang auch an der Proliferation von Lungenepithel beteiligt sein. Der Einfluss von Hyperoxie auf den Kanal kann jedoch noch immer nicht eindeutig bewiesen werden (Schwingshackl et al., 2012).

Gesichert ist jedenfalls die Tatsache, dass diverse chemische Stimuli den Kanal aktivieren. Dabei spielen Lipide (Phospholipide, ungesättigte Fettsäuren und extrazelluläre Lysophospholipide), Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) sowie pharmakologische Substanzen (Halothan, Isofluran, Diethylether, Chloroform, Antipsychotika wie Chlorpromazin, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer) eine modulierende Rolle am Carboxyterminus des Kanalproteins (Honore, 2007).

Die Regulation der funktionellen Expression der TREK-1 Kanäle kann auf transkriptionaler, post-transkriptionaler, translationaler und post-translationaler Ebene erfolgen, wie kürzlich von verschiedenen Autoren berichtet. Eine Untersuchung zum alternativen Spleißen der Gentranskripte von TREK-1 aus der Gruppe von Jürgen Daut beschreibt fünf Spleißvarianten des TREK-1: TREK-1a, -1b, -1c, -1d und -1e. Die ersten vier Spleißvarianten 1a-1d entstehen durch alternatives Spleißen von Exon 1, welches den Aminoternus codiert. TREK-1e entsteht durch Überspringen des Exons 5 mit dem Resultat, dass für Exon 6 ein neuer Leserahmen für die Proteintranslation

entsteht. Durch diesen als „Exon-Skipping“ beschriebenen Prozess entsteht das Membranprotein TREK-1e, das zwei TM und eine P beinhaltet (die Membrantopologie ähnelt der von Kir-Kanälen). Es wird selbst jedoch nicht als funktioneller Ionenkanal exprimiert. Bei Coexpression von TREK-1e mit normalen TREK-1a-1d Untereinheiten wird deren Expression an der Oberflächenmembran reduziert (Rinné, 2008). Durch alternatives Spleißen wird somit die Diversität von Kaliumkanälen erhöht.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit besteht in der alternativen Translationsinitiation. Hierbei entstehen aus ein und derselben mRNA zwei verschiedene Isoformen des TREK-1. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe und Funktion. Das um 56 Aminosäuren am Aminoterminus verkürzte Protein ist nicht mehr nur für Kaliumionen selektiv, sondern auch für Natriumionen durchlässig (Thomas, Plant, Wilkens, McCrossan & Goldstein, 2008). Andere Studien stellen ebenso die Wichtigkeit des aminoterminalen Anteils sowie der ersten Transmembrandomäne des Kanals für die Dimerisierung und den Transport des Kanals zur Plasmamembran dar (Veale, Rees, Mathie & Trapp, 2010). Aber auch die Phosphorylierung, eine wichtige posttranslationale Möglichkeit zur Regulation von Proteinen, kommt bei TREK-1 vor. Während Proteinkinasen bei TREK-1 im carboxyterminalen Bereich an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin eine Phosphatgruppe anfügen, entfernen Phosphatasen im Gegensatz dazu dort eine Phosphatgruppe. Zum Beispiel werden Serinreste (im humanen TREK-1c an den Positionen 311 und 344) durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert, was zu einer Inhibition des Kanals führt (Murbartian, Lei, Sando & Bayliss, 2005).

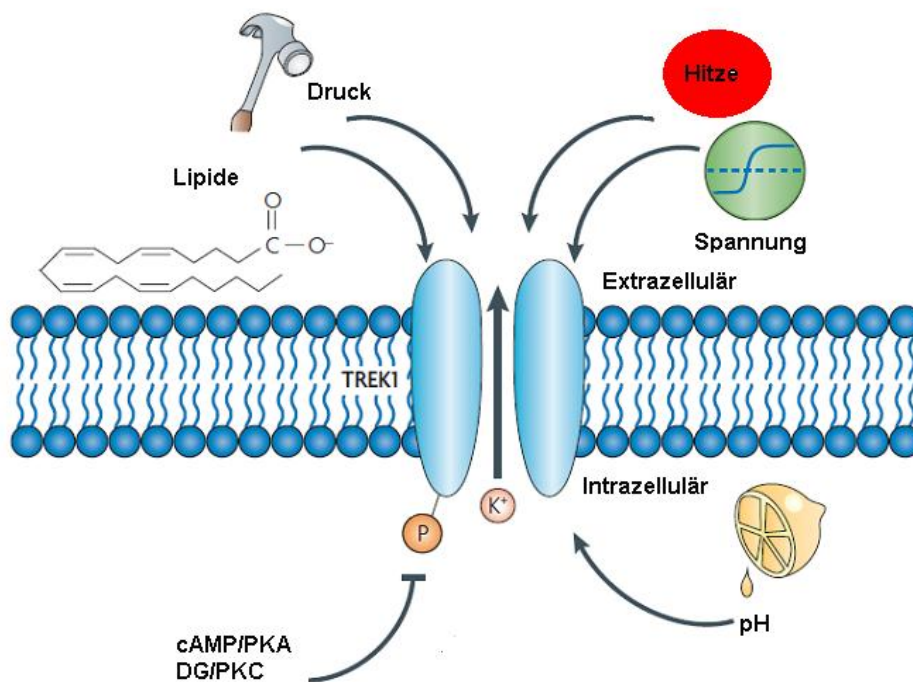


Abb. 1.4 Regulationsmechanismen des TREK-1.

TREK-1 wird durch physikalische und chemische Stimuli wie Membrandehnung, Temperaturerhöhung, intrazelluläre Azidose, Depolarisation und zelluläre Lipide geöffnet. Eine Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) führt zur Inhibierung des Kanals. [nach (Honore, 2007)]

Die Aktivierung der Proteinkinasen PKA und PKC erfolgt dabei G-Protein-gekoppelt. Die Wirkung des flüchtigen Stickstoffmonoxids (NO) wird letztendlich auch über Phosphorylierung vermittelt. NO aktiviert die zytosolische Guanylatzyklase, die dann die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat katalysiert. Dabei fungiert cGMP als second messenger indem es die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, welche den humanen TREK-1c dann am Serinrest 362 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt daraufhin zu einer Aktivierung des Kanals (Koh et al., 2001). Für das als äußerst toxisch bekannte Gas Kohlenmonoxid (CO) wird seit einiger Zeit eine Funktion als intrazelluläres Signalmolekül beschrieben (Peers & Steele, 2012). Es wird vermutet, dass CO, vergleichbar dem NO, die zytosolische Guanylatzyklase aktiviert und dann via cGMP und PKG TREK-1 aktiviert wird (Dallas, Scragg & Peers, 2008).

Aber auch diverse Proteine haben einen Einfluss auf TREK-1. Seit 2006 ist bekannt, dass das Prion Protein (PrP^{C}) mit TREK-1 interagiert; dabei ist die physiologische Rolle der Interaktion jedoch noch unklar (Azzalin et al., 2006). Außerdem wurde das PKA-Ankerprotein AKAP150 als Interaktionspartner von TREK-1 identifiziert (Sandoz et al., 2006). Durch deren Interaktion wird der auswärtsrektifizierende Kanal in einen Hintergrundkanal umgewandelt, der dann gegenüber Arachidonsäure, Membrandehnung und pH-Senkung insensitive ist. Ein weiterer Interaktionspartner ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2), das die Oberflächenexpression und den Strom des TREK-1 erhöht, jedoch keinen direkten Effekt auf die Kanaleigenschaft hat. MAP2 und AKAP150 können auch gleichzeitig an TREK-1 binden, da die Interaktion an verschiedenen Stellen stattfindet. Sie steigern dadurch die Kanalaktivität und die Kanaldichte in der Plasmamembran. Alle drei Proteine können in Neuronen als Proteinkomplexe in der Postsynapse gefunden werden (Sandoz & Lesage, 2008; Sandoz et al., 2008; Sandoz et al., 2006).

Kürzlich wurde β -COP als ein weiterer Interaktionspartner von TREK-1 identifiziert. β -COP ist eine Komponente des COP-1-Komplex und spielt eine Rolle beim COP-1-abhängigen anterograden und retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Nickel et al., 1998). Der COP-1-Komplex ist ein Heptamer, das aus zwei Subkomplexen, F-COP-1 (bestehend aus β -, γ -, δ - und ζ -COP) und β -COP-1 (bestehend aus α -, β' - und ϵ -COP) zusammengesetzt ist. Die Interaktion von β -COP mit dem Aminoterminal von TREK-1 führt zu einem Anstieg des TREK-1 Stroms, der sich durch eine erhöhte Anzahl von TREK-1 Kanälen in der Plasmamembran erklärt. β -COP scheint somit ein wichtiger Regulator für den intrazellulären Transport von TREK-1 an die Plasmamembran zu sein (E. Kim et al., 2010).

In jüngster Zeit wurde ein weiterer Interaktionspartner von TREK-1 in Myozyten gefunden. Es handelt sich um das Protein Popdc. In Myozyten hat es eine wichtige Funktion als Regulator bei der Herzfrequenzdynamik in den Schrittmacherzellen über die Bindung von cAMP. Von ihm sind drei Isoformen bekannt: Popdc 1, Popdc 2 und Popdc 3. Die Interaktion von TREK-1 und Popdc ist cAMP-abhängig. Es wurde ebenfalls belegt, dass Popdc die

Expression von TREK-1 an die Plasmamembran fördert und dadurch alle Isoformen des Proteins Popdc in *Xenopus laevis* Oozyten einen aktivierenden Effekt auf TREK-1 ausüben. Die Interaktion von Popdc ist nicht ausschließlich auf TREK-1 begrenzt und scheint eine Vielzahl an Ionenkanälen zu modulieren (Froese et al., 2012).

Als weiterer Interaktionspartner von TREK-1 wurde das Enzym Hämoxygense-2 (HO-2) in der Gruppe von Jürgen Daut identifiziert, dessen Funktionen in Kap. 1.4 genauer beschrieben werden.

1.3.2 Die physiologische Rolle von TREK-1

Unter dem Begriff Channelopathies werden Krankheiten zusammengefasst, die aus Mutationen in Ionenkanalgenen resultieren. Für Mutationen in bestimmten K⁺-Kanalgenen sind u. a. Erkrankungen des Gehirns (episodische Ataxie) oder des Herzens (long QT-Syndrome, z. B. Andersen-Tawil-Syndrom) analysiert und beschrieben worden (Adelman, Bond, Pessia & Maylie, 1995; Tristani-Firouzi & Etheridge, 2010).

Des Weiteren haben jüngste Studien einen Zusammenhang zwischen der Dekompressionskrankheit und TREK-1 beschrieben. Bei der Dekompressionskrankheit wird nach dem Tauchgang der im Blut und im Gewebe gelöste Stickstoff durch Bläschenbildung frei. Dies führt durch Embolien und Nekrosen zu fokalen Ischämien und neurologischen Ausfällen. TREK-1 kommt dabei eine neuroprotektive Aufgabe durch Modulation des prä- und postsynaptischen Membranpotentials zu (Vallee, Meckler, Risso & Blatteau, 2012).

Durch die starke Expression im Gehirn gibt es auch zahlreiche neurologische Erkrankungen, die auf einem Defekt des Kanals basieren. Sehr viel Aufschluss gab eine Versuchsreihe mit transgenen Mäusen, bei denen das kodierende Gen für den TREK-1 mutiert wurde, so dass der Kanal nicht funktionsfähig war. Diese Knock-out-Mäuse fielen durch ihre Anfälligkeit gegenüber Ischämie und Epilepsie im Gehirn auf und schienen weniger depressiv zu sein. Die bei der Ischämie vermehrt freigesetzte Arachidonsäure führt zu einer Aktivierung des TREK-1 (Franks & Honore, 2004).

In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass TREK-1 an pathophysiologischen Prozessen wie der Neuroprotektion, Schmerzwahrnehmung und Depression beteiligt ist. Deswegen ist es interessant, Moleküle zu finden, die in der Lage sind diesen Kanal zu öffnen oder zu blockieren. Sie können als mögliche Therapeutika wirksam werden und sind deswegen von klinischer Bedeutung (Moha ou Maati et al., 2011). Die Wirkstoffe Bupivacain und Curcumin sind schon länger als starke Inhibitoren von TREK-1 bekannt. Dexamethason, ein Glukokortikoidhormon, steigert die Expression von TREK-1. Das Antidepressivum Fluoxetin (selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer) und zahlreiche andere Wirkstoffe, wie die Inhalationsanästhetika Halothan, Xenon und Lachgas, inhibieren den K_{2P} -Kanal TREK-1. Riluzol hingegen ist in der Lage TREK-1 zu aktivieren (Mathie & Veale, 2007). Jüngste Untersuchungen haben ergeben, dass Spadin, ein von Sortilin abgeleitetes Peptid, als neues Antidepressivum einige Vorteile gegenüber den klassischen Antidepressiva aufweist: Es wirkt schneller und weist weniger Nebenwirkungen auf. Spadin hemmt TREK-1 und wirkt sich außerdem nicht störend auf die von TREK-2, TRAAK, TASK und TRESK induzierten Ströme aus. Es scheint also spezifisch für TREK-1 zu sein. Ein weiterer Vorteil von Spadin ist das Ausbleiben der klassischen Nebenwirkung von Antidepressiva, der kardialen Dysfunktion. Spadin kann deswegen ein interessanter Vertreter einer neuen Generation Antidepressiva sein (Moha Ou Maati et al., 2012).

1.4 Hämoxygenase-2 – ein neuer Interaktionspartner von TREK-1

Hämoxygenase-2 (HO-2) wurde kürzlich als neuer Interaktionspartner des TREK-1 identifiziert und charakterisiert (Koschinsky, 2010). Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob neben der HO-2 auch die Isoform Hämoxygenase-1 (HO-1) ein möglicher Interaktionspartner des TREK-1 ist. In den nächsten Kapiteln werden die Funktionen der Hämoxygenasen genauer beschrieben.

1.4.1 Das Substrat der Hämoxygenase - das Häm

Die lebenswichtige Funktion des Sauerstofftransports im menschlichen Blut übernimmt das Protein Hämoglobin. Dafür wird der Sauerstoff an den roten Blutfarbstoff gebunden und zu allen Geweben transportiert. Auf dem Rückweg zur Lunge ist Hämoglobin auch beim CO₂-Transport beteiligt. Das Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten (2 α , 2 β), von denen jede aus drei Komponenten besteht: Protoporphyrin, Eisen (Fe²⁺) und Globin. Wird das Fe²⁺ am Ende der Kette von acht Reaktionen in Protoporphyrin eingebaut, so entsteht Häm. Häm ist also am häufigsten als prosthetische Gruppe im Hämoglobin der Erythrozyten zu finden, ist jedoch auch an eine Vielzahl anderer Proteine wie z. B. Myoglobin, Katalase und Succinat-Dehydrogenase in der Zelle gebunden (Klinke, 2009).

1.4.2 Die Aufgaben der Hämoxygenase und ihre Produkte

Täglich werden Millionen gealterter Erythrozyten in der Leber und hauptsächlich in der Milz abgebaut. Die physiologische Funktion der Hämoxygenase besteht im initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des enzymatischen Häm-Abbaus (Maines, 1988). Freies Häm kann die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale begünstigen und fördert damit oxidativen Stress. Die Hämoxygenase spielt deswegen eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von oxidativem Stress (Bauer & Bauer, 2002; Zhu, Fan, Li, Kung & Lin, 2011). Sie reagiert in Abhängigkeit von Cytochrom-P450 und unter Verwendung von Sauerstoff (O₂) und NADPH zu Biliverdin (BV), Eisen (Fe²⁺) und Kohlenmonoxid (CO) (siehe Abb.1.5) (Maines, 1988; Tenhunen, Marver & Schmid, 1968, 1969).

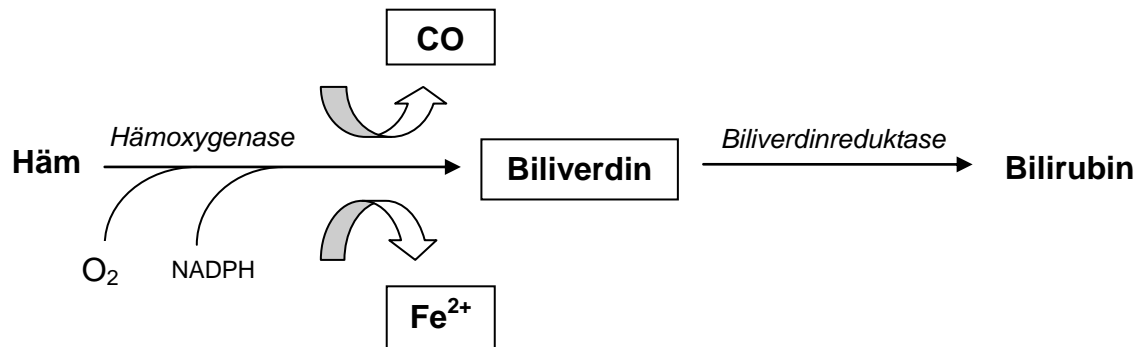


Abb.1.5 Schematische Darstellung der von der Hämoxigenase katalysierten Reaktion.

Die Hämoxigenase spaltet dabei den Eisenporphyrinring des Häms an der Methinbrücke zwischen den Pyrrolringen A und B oxidativ. Die Reaktion der Hämoxigenase folgt dabei der einer Monooxygenase. Wie an diversen Modellen von Zellschädigung und an Hämoxigenase-Knock-out-Mäusen (Poss & Tonegawa, 1997) gezeigt werden konnte, haben die Hämoxigenase und deren Produkte einen zellprotektiven Effekt (Schmidt et al., 2004; Tullius et al., 2002).

1.4.3 Biliverdin und Bilirubin

Die zytosolische Biliverdinreduktase reduziert sofort das entstehende Biliverdin zu dem lipophilen Antioxidans Bilirubin (Hosick & Stec, 2012). Hier endet bei Säugetieren der Hämstoffwechsel. Das Bilirubin wird dann in der Leberzelle an Glucuronsäure gekoppelt und über die Galle und von dort über den Darm ausgeschieden. Ein erheblicher Teil des Bilirubins wird dann erneut über den enterohepatischen Kreislauf wieder aufgenommen (Klinke, 2009). Liegt allerdings eine Störung im Bilirubinstoffwechsel vor, äußert sich das klinisch je nach Schweregrad mit einem Ikterus. Biliverdin und Bilirubin werden antioxidative Wirkungen zugeschrieben. Sie können die unerwünschte Oxidation anderer Substanzen verhindern (Slebos, Ryter & Choi, 2003; Stocker, Yamamoto, McDonagh, Glazer & Ames, 1987). Dennerly und Mitarbeiter zeigten im Tiermodell, dass ein erhöhter Bilirubin-Plasmaspiegel vor Hypoxie-vermittelter oxidativer Schädigung schützen kann (Dennerly, McDonagh, Spitz, Rodgers & Stevenson, 1995).

1.4.4 Eisen

Eisen, das in den Oxidationsstufen +2 und als +3 in biologischen Systemen vorliegen kann, ist eines der wichtigsten Spurenelemente im menschlichen Körper. Dort kommt es hauptsächlich in prosthetischen Gruppen (Häm oder Eisen-Schwefel-Cluster) verschiedener Enzyme bzw. Transportproteine vor. Es kann in Ferritin gespeichert oder in Transferrin im Blut transportiert werden (Donovan & Andrews, 2004). Ferritin kann zum Beispiel endotheliale Zellen vor oxidativen Schädigungen schützen. Die zellprotektive Wirkung von Fe^{2+} wird auch in der transplantierten Leber durch Ischämie-Reperfusion deutlich (Balla et al., 1992). Da Eisen leicht zwischen seinen Oxidationsstufen +2 und +3 wechseln kann, spielt es im Rahmen der ATP-Synthese bei den Enzymkomplexen der mitochondrialen Atmungskette eine bedeutende Rolle. Eine weitere wichtige Aufgabe des Fe^{2+} liegt in der Bildung von roten Blutkörperchen im Knochenmark (Erythropoiese) und dem Sauerstofftransport im Blut mittels Hämoglobin.

1.4.5 Kohlenmonoxid

In der vergangenen Zeit wurde Kohlenmonoxid (CO) lediglich als toxisches Abfallprodukt aus den Metabolismen des menschlichen Körpers gesehen. In den letzten Jahren jedoch hat das Verständnis für CO als wichtiges intrazelluläres Signalmolekül zugenommen. Bemerkenswert ist dabei auch, dass es zu einem überwiegenden Teil aus dem Häm-metabolismus entsteht, es also endogen von Hämoxxygenasen selbst gebildet wird und dann über die Lunge abgeatmet wird. Zahlreiche Untersuchungen haben belegt, dass CO zum Beispiel eine Wirkung auf Ionenkanäle hat, dass es neuroprotektiv wirkt und die Ausschüttung von Neurotransmittern und Neuropeptiden veranlassen kann (Wu & Wang, 2005). Die endogenen Signalwege des Kohlenstoffmonoxids sind sehr vielfältig.

Der Kanal TREK-1 wird auch von CO moduliert. Hierbei wird die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch CO diskutiert, die zu einem erhöhten zyklischen Guanosinmonophosphat-Spiegel führt. Guanosinmonophosphat (cGMP) aktiviert dann wiederum die Proteinkinase G (PKG) (H. P. Kim, Ryter

& Choi, 2006). Um TREK-1 zu modulieren ist es nötig, dass die PKG den Kanal an Aminosäureposition 351 phosphoryliert (Koh et al., 2001). Für den TREK-1c sind außerdem noch eine Reihe weiterer Phosphorylierungsstellen bekannt, die jedoch von anderen Proteinkinasen, wie der PKC (Serinreste an Position 311 und 344) und PKA (Serinrest an Position 344), phosphoryliert werden und dann ebenfalls zu einer Inhibition des TREK-1c führen (siehe 1.3.1) (Koschinsky, 2010).

In jüngster Zeit wurde die Wirkung des CO auf den spannungsabhängigen $K_v2.1$ Kanal belegt. CO hemmt den Kanal reversibel und bietet durch dessen Modulation Schutz vor Apoptose. Die Mechanismen ähneln dabei denen bei TREK-1c. Die Inhibition des Kanals $K_v2.1$ wird durch CO über die PKG-Aktivierung und durch ROS (reaktive Sauerstoffspezies) vermittelt, die durch CO vermehrt in den Mitochondrien gebildet werden (Dallas et al., 2011; Peers, 2011).

Zusätzlich zu der PKG wird auch noch ein anderes Molekül durch CO aktiviert: die mitogen aktivierte Proteinkinase p38 MAPK. Durch CO vermittelt, spielt sie im weiteren Verlauf eine wichtige Rolle bei den zytoprotektiven, antiinflammatorischen und antiproliferativen Effekten (H. P. Kim et al., 2006).

Wie schon erwähnt werden CO antiinflammatorische und antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben. Dabei wirkt CO unter anderem auch durch eine Hemmung der Expression von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β) und durch die Stimulation der Synthese von antiinflammatorischen Zytokinen wie dem IL-10 (Otterbein & Choi, 2000). CO ist außerdem gemeinsam mit der Hämoxygenase-1 an der DNA Reparatur beteiligt (Otterbein et al., 2011). Ein vasodilatatorischen Effekt, plättchen- und proliferationshemmende Wirkung sowie Einfluss auf die Erregungsübertragung konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Fagone et al., 2012). CO wirkt einerseits aktivierend auf die im Zytosol vorliegende Guanylatzyklase und führt so zu einer Vasorelaxation (Furchgott & Jothianandan, 1991; Maines, 2005), andererseits hemmend auf die Cytochrom-Oxidase und ist in der Lage an Hämoglobin gebundenen Sauerstoff aus seiner Bindung zu verdrängen. Das dabei entstandene Carboxyhämoglobin ist dann nicht mehr in der Lage O_2 zu transportieren. Die Folge davon ist eine CO-Vergiftung, gekennzeichnet durch die anfänglichen

Symptome von Kopfschmerz, Schwindel und Bewusstseinsstörungen, die nicht selten einen letalen Ausgang findet.

1.5 Die Hämoxygenase-Isoenzyme

Derzeit sind drei Isoformen der Hämoxygenase (HO) bekannt: HO-1, HO-2 und HO-3. Im menschlichen Körper werden jedoch nur die HO-1 und die HO-2 exprimiert. Alle drei unterscheiden sich in ihrem Vorkommen in den Geweben, in ihrer Regulation sowie in ihrem Expressionsmuster (McCoubrey, Huang & Maines, 1997). Der HO-3 wird eine geringe Aktivität zugeschrieben (Elbirt & Bonkovsky, 1999). Sie wurde bisher nur im Gehirn der Ratte gefunden (Maines, 2005). Mit ihrem Molekulargewicht von 32 kDa scheinen die beiden Enzyme HO-3a und HO-3b eine Pseudovariante von HO-2 zu sein (Hayashi et al., 2004).

	HO-1 (HSP-32)	HO-2	HO-3
Physiologische Funktionen	Häm-Abbau antioxidative Abwehr neuronale Signaltransduktion Regulation des Gefäßtonus antiinflammatorisch antiapoptotisch	Häm-Abbau Häm-Bindung Regulation des Gefäßtonus neuronale Signaltransduktion	Häm-Bindung
Konstitutive Expression	Milz Leber	In meisten Geweben (ZNS, Retina, Leber, Milz, Hoden, Lunge, Niere, Gefäße)	in den meisten Geweben
Induktoren	Sehr verschieden, z. B.: oxidativer Stress, Zytokine, Hypoxie Hitzeschock, NO, H ₂ O ₂ , UVA Schwermetalle	Glukokortikoide, Opiate	nicht bekannt
Enzymaktivität	V _{max} = 3,4 µmol/mg/h	V _{max} = 0,24 µmol/mg/h	vernachlässigbar

Tab. 1 Darstellung der wichtigsten Funktionen und Eigenschaften der HO-Isoenzyme.
[modifiziert nach (Wagener, et al., 2003)]

1.5.1 Die Hämoxygenase-2

Die HO-2 ist in allen Geweben auffindbar, jedoch hauptsächlich konstitutiv im ZNS, Glomus caroticum sowie im Hoden exprimiert (Kinobe, Dercho & Nakatsu, 2008). Maines und Mitarbeiter zeigten erstmals, dass die HO-2 in der Leber eine deutlich stärkere Aktivität als die HO-1 aufweist (Maines, Trakshel & Kutty, 1986). Die HO-2 hat ein Molekulargewicht von 36 kDa und weist drei hämregulatorische Motive (HRM 1-3) auf, welche in der HO-1 nicht zu finden sind (siehe Abb.1.6). Die Cysteinreste von HRM 1 und HRM 2 an den Positionen 265 und 282 bilden unter physiologischen Bedingungen eine Disulfidbindung. Sowohl bei der HO-1 als auch bei der HO-2 dient die Aminosäure Histidin an Position 25 bzw. 45 als Hämbindestelle mit hoher Affinität. Unter hypoxischen Bedingungen werden die Disulfidbindungen reduziert, wodurch die Affinität für Häm sinkt. Dadurch wird weniger Häm abgebaut und es wird weniger CO gebildet. Damit kontrollieren die HRMs die Aktivität der HO-2 durch Regulation der Hämbindung an das Enzym (Yi et al., 2009).

```

heme_oxygenase1  -----MERQPDSMP-----QDLSEALKEATKEVHTQAENAEFMRNFQKG 40
heme_oxygenase2  MSAEVETSEGVDESEKKNNGALEKENQMRMADLSELLKEGTKEAHDRAENTQFVKDFLKG 60
                  *:  ::::  *****  *:  ::::  *:  **

heme_oxygenase1  QVTRDGFKLVMASLYHIYVALEEEIERNKESPVFAPVYFPEELHRKAALQDLAFWYGPR 100
heme_oxygenase2  NIKKELFKLATATALYFTYSALEEEEMERNKDHPAFAPLYFPMELHRKEALTKDMEYFFGEN 120
                  ::::  ***  ::::  *  *****:*****  *:***:***  *****  *:  :::  :::  .

heme_oxygenase1  WQEVIPYTPAMQRYVKRLHEVGRTEPELLVAHAYTRYLGDLGGQVLKKIAQKALDLPSS 160
heme_oxygenase2  WEEQVQPKAAQKYVERIHYIGQNEPELLVAHAYTRYMGDLGGQVLKKVAQRALKLPST 180
                  *:  :  .  *  *:***:***  *:  .*****:*****:*****:***:***:***:

heme_oxygenase1  GEGLAFFTFPNIASATKFKQLYRSRMNSLEMTPAVRQRVIEEAKTAFLNLIQFEEELQEL 220
heme_oxygenase2  GEGTQFYLFENVDNAQQFKQLYRARMNALDLNMKTKERIVEEANKAFEYNMQIFNELDQA 240
                  ***  *:  *  *:  .  *:*****:***:***:  .:::***:***:  *:***:***:

heme_oxygenase1  LTHDTKDQSPSRAPGLRQRASNKVQDSAPVETPRGKP-----PLNTRS---QAPLLRWVL 272
heme_oxygenase2  GSTLARETLEDGFPVHDGKGMKCPFYAAEQDKGALEGSSPFRTAMAVLRKPSLQFIL 300
                  :  :::  .  *  :..  :  ..*  :*  *:  .  :  *  *:***:

heme_oxygenase1  TLSFLVATVAVGLYAM 288
heme_oxygenase2  AAGVALAAGLLAWYYM 316

```

Abb.1.6 Sequenzvergleich von humaner Hämoxygenase-1 und Hämoxygenase-2.

Die Hämbindungsstelle an His²⁵ und His⁴⁵ ist rot unterlegt. Die hämregulatorischen Motive sind grün unterlegt. Gleiche Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet. Alle Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt.

Die HO-2 wird zu den Plasmamembran-assoziierten Proteinen vom Typ II gezählt. Der N-Terminus ist intrazellulär lokalisiert und durch den distalen C-Terminus wird die HO-2 in der Membran verankert (Yi et al., 2009). Untersuchungen in Zyanobakterien haben gezeigt, dass die HO-2 um Häm binden zu können ein Homodimer bildet, das aus α -Helices besteht (Sugishima et al., 2005).

Wie in Abb. 1.6 dargestellt, liegt eine Homologie in der Aminosäuresequenz der menschlichen Hämoxygenasen-1 und -2 von 45 % vor. Die beiden Enzyme unterscheiden sich stark in ihrem C-terminalen Anteil (Bianchetti, Yi, Ragsdale & Phillips, 2007).

Die HO-2 wurde als Interaktionspartner des Ca^{2+} -sensitiven Kaliumkanals (BK-Kanal) identifiziert und wird aufgrund seiner hypoxiesensiblen Eigenschaft als Sauerstoffsensor diskutiert (Williams et al., 2004).

1.5.2 Die Hämoxygenase-1

Die HO-1, die ein Molekulargewicht von 32 kDa hat, wurde zum ersten Mal im Jahre 1968 erwähnt (Tenhunen et al., 1968). Sie wird unter physiologischen Bedingungen in den meisten Zellen und Geweben nur wenig oder in nicht nachweisbaren Mengen exprimiert. Sie besteht aus fünf Exonen und insgesamt 288 Aminosäuren. Da in der Milz der Abbau von gealterten Erythrozyten am stärksten ist und hier der Anteil freien Häms sehr hoch ist, ist auch hier die Expression der HO-1 viel höher als die der anderen Isoenzyme (Scholtes, 2006). Durch Eliminierung des zytotoxischen Häms spielt HO-1 eine Schlüsselrolle bei der Modulation des intrazellulären Häm-Levels. Die Regulation der induzierbaren HO-1 ist äußerst vielfältig, findet jedoch hauptsächlich auf der Ebene der Transkription statt. Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie z. B. Nrf2 (NF-E2 related factor 2), NF- κ B und AP-1 (Aktivator-Protein) und einige Transkriptionsrepressoren wie z. B. BTB und CNC homologue 1 (Bach1) steuern die Expression des HO-1 Gens (Warnatz et al., 2011). Die HO-1 wird von vielen diversen Stimuli induziert. Dazu gehören neben dem Häm z. B. Zytokine, Hitzeschock, NO, H_2O_2 , UV-Bestrahlung, Schwermetalle aber auch bakterielle Lipopolysaccharide. Diese Stimuli besitzen alle eine gemeinsame Eigenschaft: Sie sind in der Lage

freie Sauerstoffradikale zu produzieren und rufen damit oxidativen Stress und pathologische Verhältnisse hervor (Otterbein & Choi, 2000). Deswegen liegt die Vermutung nahe, dass die HO-1, wie schon erwähnt, eine wichtige zellprotektive Aufgabe erfüllt und außerdem immunmodulatorisch wirkt (Paine, Eiz-Vesper, Blasczyk & Immenschuh, 2010). Sie wird deshalb auch unter dem Namen HSP-32 in der Gruppe der Hitzeschockproteine geführt. Neuere Veröffentlichungen berichten über die protektive Wirkung der HO-1 im Rahmen eines Myokardinfarkts (Burger, Xiang, Hammoud, Lu & Feng, 2009), des hämorrhagischen Schocks (Umeda et al., 2009) und einer Hypoxie (Chang, Chan, Cheng, Tsai & Chan, 2009). Außerdem werden der HO-1 antiinflammatorische Eigenschaften bei gastrointestinalen Entzündungen zugeschrieben. Die Überexpression von HO-1 kann dann auf eine bestehende Colitis lindernd wirken (Zhu et al., 2011). Die Hämoxygenase-1 kann also als universelles Stressprotein gesehen werden.

1.6 Fragestellung

Das genaue Verständnis der Regulation von TREK-1 ist von großem Interesse, da dieser K_{2P} -Kanal an wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt ist. HO-2 wurde bereits als Interaktionspartner des TREK-1 und weiterer K_{2P} -Kanälen wie TREK-2 identifiziert und es zeigte sich, dass die Interaktionen zu einer Steigerung der Stromaktivität der Kanäle führen.

In dieser Arbeit soll die Isoform HO-1 als möglicher Interaktionspartner für TREK-1 und weitere K_{2P} -Kanäle untersucht werden. Ziel ist es, mit Hilfe der gewonnenen Ergebnisse zum einen eine Aussage über die Spezifität der HO-2-Interaktionen machen zu können und zum anderen die für die Interaktionen wichtigen Sequenzbereiche identifizieren zu können.

Dazu sollen zunächst HO-1 und HO-2 zusammen mit TREK-1 und weiteren K_{2P} -Kanälen in einem speziellen System, welches Protein-Interaktionen membranständiger Proteine untersucht, getestet werden. Anschließend soll ein möglicher funktioneller Effekt von HO-1 auf TREK-1-Kanäle untersucht werden und mit HO-2 verglichen werden.

Zur Durchführung von Immunpräzipitationen werden TREK-1-Konstrukte mit einer spezifischeren Antigenität benötigt. Dazu soll TREK-1 zum einen mit dem Hämagglutinin-Epitop (HA) und zum anderen mit dem „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) fusioniert werden und anschließend in immunochemischen Reaktionen getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Komponente	Hersteller
30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid	Merck
Adenin	Sigma
Agarose	Sigma
Acetat	Merck
APS	Merck
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Carl Roth
CaCl ₂	Sigma
DMEM	Gibco Invitrogen
DMSO	Sigma
2 mM dNTP Mix	Stratagene
10 mM dNTP Mix	Stratagene
Dropout Supplement	Clontech
DTT	Sigma
Entwickler-Lösung	AGFA
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma
FCS	PAA Cell Culture Company
Fixier-Lösung	AGFA
Gentamycin	Sigma
Glycerin	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
Hefeextrakt	Sigma

HEPES	Sigma
Hexanukleotide	Roche
KCl	Merck
Lachssperma	Sigma
Ligasepuffer	Fermentas
LiOAc	Sigma
Lipofectamin	Roche
MgCl ₂	Merck
Minimal SD Base	Clontech
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumpyruvat	Merck
Penicillin	PAA Cell Culture Company
Ponceau S	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Restriktionspuffer 2	Fermentas
Restriktionspuffer Fast Digest	Fermentas
Roti®Block	Carl Roth
RT-Puffer	Invitrogen
SDS	Carl Roth
Streptomycin	PAA Cell Culture Company
Theophyllin	Sigma
TRIS	Carl Roth
TRIS/HCl	Carl Roth
Triton X- 100	Serva
Xylencyanol FF	Sigma
YPD Broth	Sigma

2.1.2 Ausrüstung

Bakterienstämme:

Chemisch kompetente Zellen des Stamms *Escherichia coli*:

DH5α [Genotyp: F⁻φ80*lacZ*ΔM15Δ (*lacZYA-argF*) U169*deoRrecA1endA1hsdR19* (r_K⁻,m_K⁺)*phoA**supE44**thi1**gyrA96relA1λ⁻*], Invitrogen

Hefestämme:

***Saccharomyces cerevisiae*:**

NMY51 [Genotyp: MATa; his3 Δ 200; trp1-901; leu2-3,112; ade2; LYS2::(lexAop)4-HIS3; URA3::(lexAop)8-lacZ; ade2::(lexAop)8-ADE2; GAL4], MoBiTec

Komplettsysteme (Kits):

Minipräparation:	E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I, Omega bio-tek
Midipräparation:	CompactPrep Plasmid Midi Kit, Qiagen
PCR-Aufreinigung:	PCR Purification Kit, Qiagen
Gelextraktion:	Gel Extraction Kit, Qiagen
cRNA-Synthese:	mMESSAGEmMACHINE T7® Kit, Ambion
Mutagenese:	QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene

Zelllinien:

Für Proteingewinnung nach transienter Transfektion: HeLa-Zellen

Transfektionsreagenzien:

Für HeLa-Zellen: Lipofectamine, Roche

Längenstandardmarker:

DNA-Marker: λ DNA Eco471 13, 0,5 μ g/ μ l, Fermentas
Proteinmarker bei SDS-PAGE: PageRuler® Protein Ladder, Fermentas

Antikörper für Westernblot:

Erstantikörper:	Anti-HA-rat monoclonal, Roche
Zweitantikörper:	Anti-rat IR Dye 800, LI-COR
Erstantikörper:	rabbit polyclonal GFP ab290, Abcam
Zweitantikörper:	Anti-rabbit IR Dye 680 polyclonal, LI-COR

Plasmide:

Für die Expression von hTREK-1c in *Xenopus laevis* Oozyten wurde hTREK-1c in den Vektor pSGEM kloniert (Vektorkarte siehe Anhang).

Die aminoterminal Fusion des Hämagglutinin-Epitops an hTREK-1c erfolgte in dem Vektor pcDNA3.1. Zur Fusion von EGFP an den Carboxyterminus von hTREK-1c wurde die kodierende Region des Ionenkanals in den Vektor pEGFP-N1 kloniert, wobei das Stopcodon des hTREK-1c durch die Aminosäure Glycin ersetzt wurde (Vektorkarten siehe Anhang).

Für die Hefe-zwei-Hybrid-System Versuche wurden der Ködervektor pBT3-N und der Beutevektor pPR3-N verwendet.

Die kodierende Region der humanen Hämoxygenase-1 wurde sowohl in Oozytenexpressionsvektor pSGEM als auch in den Beutevektor pPR3-N kloniert.

Enzyme:

Restriktionsenzyme:

DNA-Verdau (Restriktionsenzyme)	
HindIII	Fast Digest, Fermentas
NotI	Fast Digest, Fermentas
XbaI	Fast Digest, Fermentas
NheI	Fast Digest, Fermentas
DpnI	Fast Digest, Fermentas
EcoRI	Fast Digest, Fermentas
BamHI	Fast Digest, Fermentas
SfiI	New England Biolabs

Modifizierende Enzyme		
Enzymklasse	Name	Hersteller
Ligase	T4 Ligase	New England Biolabs
Polymerase	TurboPfu	New England Biolabs
Reverse Transkriptase	Superscript II	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase	Fast AP	Fermentas

Oligonukleotide:**Primer für Mutagenese**

Gen	Name des Primers	Sequenz in 5'-3' Richtung
hTREK-1c-HA	hTREK-1c-HA-For	CATCACCAAATGGCATACCCATACGACGT CCCAGACTACGCTATGAACCCACGAGC
	hTREK-1c-HA-Rev	GCTCGTGGGTTCATAGCGTAGTCTGGGAC GTCGTATGGGTATGCCATTTGGTGATG
hTREK-1c	hTREK-1c-*423G-Apal- FOR	GAGAACATCAAAGGGGCCCTCTCTTTAAAT AAC
	hTREK-1c-*423G-Apal- REV	GTTATTTAAAGAGAGGGGCCCTTTGATGTT CTC

Primer für Klonierungen

Gen	Name des Primers	Sequenz in 5'-3' Richtung
hHMOX-1	hHMOX-1-BamHI-For	ACGAGCCCAGCAGGATCCGGATGGAGCGTC
	hHMOX-1-HindIII-Rev	GCCCTGGGAGCAAGCTTGCCTGCATTCACA
	hHMOX-1-SfiI-For2	CAGCACGAACGAGGGCCATTACGGCCGGGATGGA GCGTC
	hHMOX-1-SfiI-Rev	CAAAGTTCATGGCCGAGGCGGCCAGCATGCCTGC ATT

Primer für Sequenzierung

Name des Primers	Sequenz in 5'-3' Richtung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pcDNArev	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Geräte:

Brutschrank:	FunctionLife, Heraeus
Digital-Analog-Umwandler:	TEC-05X npf, Nationalinstruments
Glaskapillaren (Injektion):	3,5 Drummond Replacement Tubes, Drummond Scientific Company
Glaskapillaren (Messung):	GB150TF-8P1, 05x1,50x80 mm, Scienceproducts
Heizblock:	Thermomixer 5436, Eppendorf
Infrarot Imaging-System:	Odyssey Sa, LI-COR
Kamera:	Chromaphor, DVC
Mikromanipulator:	Nanoject II, Drummond Scientific Company
Mikropipettenpuller:	DMZ-Universal Puller, Zeitz
Mikroskop:	Leica WILD M3C
Scanner:	1640SU, EpsonPerfection
Schüttler:	Cellstar, IntermedNunc 3005, GFL
Spektralphotometer:	SmartSpec [®] 3000, Biorad
Thermocycler:	MJ Mini, Biorad GeneAmp [®] , PCR System 2700
UV-Licht:	MWG-Biotech
Vakuumpumpe:	Institutwerkstatt
Verstärker:	Turbo TEC-10CX, npf Instruments
Wasserbad:	1083, GFL
Zellinkubator:	Hera Cell 240, Heraeus
Zentrifuge:	Biofugefresco, Heraeus Biofuge 28 RS, Thermo scientific

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologie

2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien fand bei 37 °C über Nacht in flüssigem LB-Medium schüttelnd oder auf LB-Agar-Platten statt.

LB-Medium (Roth)	
Komponente	Konzentration (g/L)
Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	10

2.2.1.2 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in kompetente *E. coli* Zellen des Stammes DH5 α transformiert.

Die Zellen wurden zu Beginn auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 8 μ L der DNA hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die LB-Agarplatten wurden bei 37 °C im Brutschrank vorgewärmt. Anschließend wurden die Zellen für 40 s einem Hitzeschock bei 37 °C ausgesetzt, wobei Poren in der Membran entstehen, so dass die DNA in die Zellen gelangen konnte und erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Zur besseren Vermehrung wurden die Zellen mit 950 μ L LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden dann bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert, 850 μ L des Überstands verworfen und schließlich auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA: Minipräparation

Mit einer Pipettenspitze wurden einzelne Klone von der LB-Agarplatte abgenommen und über Nacht in LB-Medium mit dem zugehörigen Antibiotikum bei 37 °C im Schüttler angezüchtet. Am folgenden Tag wurde die Suspension in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 5000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Mit Hilfe des „E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I“ wurde nach Herstellerangaben die Plasmid-DNA isoliert, in 100 µL sterilem H₂O eluiert und anschließend die Konzentration der DNA bei 260 nm photometrisch bestimmt. Als Kontrolle, ob das zu klonierende DNA-Fragment tatsächlich im Plasmid enthalten ist, wurde ein Kontrollverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen durchgeführt und dieser anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um die Fragmentgröße zu bestimmen (siehe Kapitel 2.2.1.6).

2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA: Midipräparation

Die DNA-Gewinnung im größeren Maßstab wurde mit einem „CompactPrep Plasmid Midi Kit“ durchgeführt. Hierfür wurde eine 50 mL Übernachtskultur LB-Medium mit dem zugehörigen Antibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm im Schüttler inkubiert. Für die Plasmidisolierung wurde das Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde ebenfalls photometrisch bestimmt.

2.2.1.5 DNA- / RNA- Konzentrationsbestimmung

Um die Reinheit und Konzentration der DNA bzw. RNA zu bestimmen, wurden sie mittels Spektralphotometer bei 260 bzw. 280 nm gegen H₂O gemessen. Dazu wurde die DNA- oder RNA-haltige Lösung 1:100 mit H₂O verdünnt und die Extinktion in einer Quarzküvette im Spektralphotometer bei oben genannten Wellenlängen gemessen. Um die Konzentration C exakt zu berechnen, wird für DNA $n = 50 \text{ µg/mL}$ und für RNA $n = 40 \text{ µg/mL}$ angenommen. Daraus ergibt sich die Formel $C = OD_{260} \cdot n \cdot f$

(f = Verdünnungsfaktor). Der Reinheitskoeffizient ergibt sich aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} und ist eine Größe, die über die Verunreinigung der DNA bzw. RNA Auskunft gibt. Für reine Nukleinsäuren sollte ein Reinheitskoeffizient von $\geq 1,7$ erreicht werden.

2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Als Qualitätskontrolle wurde die DNA bzw. RNA in 1,5%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde 1,5 g Agarosepulver (Sigma) in 100 mL TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (einfach konzentriert) gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Danach wurde 1 μ L Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben und der Ansatz in den Gelkammern zur Erkaltung und Verfestigung verteilt. Die fertigen Gele wurden dann bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngiger DNA und fluoresziert unter UV-Licht.

Für die Auftrennung der Nukleinsäuren wurde 1 μ g DNA bzw. RNA mit H₂O auf 10 μ L aufgefüllt, mit 3 μ L Gelladepuffer versehen und in die Geltasche pipettiert. Um die Größe der aufgetrennten Nukleinsäuren abschätzen zu können, wurden zusätzlich 8 μ L eines DNA-Markers aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auftrennung in einer mit 1x TAE-Puffer befüllten Agarosegelelektrophoresekammer für 30 min bei 80 V. Die nach Größe aufgetrennten Nukleinsäuren wurde dann unter UV-Licht visualisiert und für die Auswertung und Dokumentation photographiert und gespeichert.

Gelladepuffer	
Komponente	Konzentration
Bromphenolblau	0,2 % (v/v)
Xylencyanol FF	0,25 % (v/v)
Glycerin	30 % (v/v)

TAE-Puffer (50x)	
Komponente	Konzentration (mM)
TRIS	40
Essigsäure	20
EDTA	1
pH 8,0 mit NaOH einstellen	

2.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma SeqLab durchgeführt. Für die Auswertung und den Vergleich der Sequenzen wurden verschiedene Programme unter NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), ExPASy (Expert Protein Analysis System) und DNASTAR verwendet.

Sequenzierungsansatz	
Komponente	Volumen (μL)
Plasmid-DNA ($\sim 1 \mu\text{g}$)	5
Primer ($10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$)	2
Gesamt	7

2.2.1.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Um einen gezielten Austausch, eine gezielte Einführung (Insertion) oder die Entfernung (Deletion) von Aminosäuren durchzuführen, wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet.

Ein Zyklus der PCR wird in drei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA bei 96°C , damit aus der doppelsträngigen DNA leichter amplifizierbare Einzelstränge werden. Im zweiten Teil der PCR wird die Reaktion auf die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer gebracht. Dies erleichtert die Anlagerung der Primer an die komplementären Abschnitte der Einzelstränge. Im letzten Schritt wird die Temperatur eingestellt, bei der die Taq-Polymerase am effektivsten arbeitet, dies ist bei 72°C . Sie synthetisiert ausgehend von der 3'-OH-Gruppe der Primer, in Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) den Einzelstrang zum komplementären Doppelstrang. In einem PCR-Zyklus entstehen aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül zwei neue, identische Doppelstränge. Die Vervielfältigung erfolgt exponentiell.

Folgender Ansatz wurde hierfür benutzt:

PCR (Reaktionsansatz für eine Reaktion)	
Komponente	Volumen (µL)
Vorwärts-Primer (10 pmol/µL)	0,45
Rückwärts-Primer (10 pmol/µL)	0,45
DMSO	1,5
dNTP-Mix (10 mM)	0,3
10x Reaktionspuffer	1,5
Turbo-Pfu	0,3
Plasmid-DNA	0,6
H ₂ O	9,9
Gesamt	15

Für die Vervielfältigung des Plasmids wurde die Turbo-Pfu-Polymerase verwendet. Dabei wurden komplementäre Primerpaare eingesetzt, die beide die gewünschte Mutation enthielten. Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass sie links und rechts von der Mutationsstelle mit mindestens 12 Nukleotiden des komplementären DNA-Stranges überlappten.

Thermocyclereinstellungen			
	Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Aktivierung der Polymerase	1	96	0,5
Denaturierung	18	96	0,5
Primer Anlagerung		55	1
Elongation		68	18
Endelongation	1	68	2
Kühlung		4	∞

Anschließend war die Entfernung der methylierten doppelsträngigen DNA, die als Matrize diente, notwendig. Dazu wurde der Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI (0,3 µL) versetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Amplifikationskontrolle wurden abschließend 2 µL des Restriktionsansatzes mit 2,5 µL Ladepuffer und 5 µL Wasser versetzt, auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V für 30 min aufgetrennt. Um die Größe der aufgetrennten Nukleinsäuren abschätzen zu können, wurde ein Längenstandard mit aufgetragen.

2.2.1.9 Reverse Transkription

Mit der Reversen Transkription (RT) kann RNA in komplementäre Desoxyribonucleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Die Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Geweben (z. B. Hirn, Leber) wurde von der Firma Clontech bezogen.

Als Reverse Transkriptase wurde das Enzym Superscript II von der Firma Invitrogen verwendet.

Für die Erzeugung von cDNA wurde 1 µg RNA pro Ansatz verwendet und mit 0,5 µL Hexanukleotiden für 10 min bei 70 °C denaturiert und im Anschluss auf Eis abgekühlt.

Reaktionsansatz für die Reverse Transkriptase	
Komponente	Volumen
RNA (1 µg/µL)	1 µL
H ₂ O	9 µL
Hexanukleotide	0,5 µL
10 min bei 70 °C, Abkühlung auf Eis	
5x RT-Puffer	5 µL
2mM dNTP	6 µL
0,1 M DTT	2,5 µL
Superscript II	1 µL
Gesamt	25 µL

Der Reaktionsansatz wurde für 50 min bei 42 °C inkubiert und anschließend das Enzym für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

2.2.1.10 RT-PCR zur Vervielfältigung spezifischer Genabschnitte

Zur Vervielfältigung der kodierenden Region von HO-1 und gleichzeitiger Einführung der spezifischen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wurden zwei verschiedene Reaktionsansätze benutzt. Die dafür verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.2 aufgeführt.

Folgende Reaktion wurde für die Einführung der Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme SfiI (spätere Klonierung dieses Fragmentes erfolgte in den Vektor pPR3-N) und BamHI und HindIII (spätere Klonierung dieses Fragmentes erfolgte in den Vektor pSGEM) angesetzt:

Reaktionsansatz für die RT-PCR	
Komponente	Volumen (µL)
10x PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl ₂)	2
2 mM dNTP	2
Vorwärts-Primer [5 pmol/ µL]	2
Rückwärts-Primer [5 pmol/µL]	2
DMSO	0,8
cDNA (RT-Ansatz aus 2.2.1.9)	0,7
AmpliTaQ Gold Polymerase	0,12
H ₂ O	10,38
Gesamt	20

Der Zyklus der PCR wird wie oben beschrieben in drei Schritte unterteilt (siehe ortsgerichtete Mutagenese 2.2.1.8).

Thermocyclereinstellungen			
	Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Aktivierung der Polymerase	1	95	5
Denaturierung	35	95	0,5
Primer Anlagerung		55	0,5
Elongation		72	1,5
Endelongation	1	72	10
Kühlung		4	

Als Qualitätskontrolle wurden anschließend 5 µL des Reaktionsansatzes mit Gelpuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Zudem wurde zur Abschätzung der Größe der Amplifikate ein Längenstandard aufgetragen.

2.2.1.11 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen und DNA-Ligation

Für den Restriktionsverdau der DNA wurden entweder „Fast Digest“ Restriktionsenzyme der Firma Fermentas, (hierbei wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert), oder das Restriktionsenzym Sfil der Firma New England Biolabs (hierbei wurde für 120 min bei 50 °C inkubiert) verwendet. Um den Vektor zur Klonierung verwenden zu können und eine Eigenligation des Vektors zu verhindern, wurde dieser mit intestinaler alkalischer Phosphatase aus dem Kalb behandelt. Dafür wurde das Enzym Fast AP der Firma Fermentas eingesetzt. Zunächst wurde der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend, um das Enzym zu deaktivieren, 5 min bei 75 °C erhitzt.

Restriktionsverdau mit Fast Digest Enzymen	
Komponente	Volumen (µL)
Plasmid-DNA (~ 1 µg)	1
10x Fast Digest Restriktionspuffer	1
Restriktionsenzym	1
H ₂ O	7
Gesamt	10

Restriktionsverdau mit Sfil	
Komponente	Volumen (µL)
Plasmid-DNA (1 µg)	1
10x Restriktionspuffer 2	1
10x BSA	1
Restriktionsenzym Sfil (10 U/µL)	0,5
H ₂ O	6,5
Gesamt	10

Ansatz für eine DNA-Ligation	
Komponente	Volumen (µL)
Isoliertes DNA-Fragment	6
Vektor	2
10x Ligasepuffer	1
T4 DNA Ligase	1
Gesamt	10

Das in den Vektor zu klonierende DNA-Fragment wurde nach entsprechendem Restriktionsverdau mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die entsprechende DNA-Bande nach Sichtbarmachung auf dem UV-Schirm ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits der Firma Qiagen gemäß der Herstellerangaben aus der Gelmatrix isoliert.

Die DNA-Ligation wurde mit T4 DNA Ligase durchgeführt und entweder für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend in Bakterienzellen transformiert (Kap. 2.2.1.2).

2.2.1.12 *In vitro*-Transkription

Die cRNA, die für die Proteinexpression in *Xenopus laevis* Oozyten benötigt wird, wurde mittels mMESSEAGEmMACHINE® T7 Kit hergestellt.

Zu Beginn wurden die entsprechenden kodierenden Regionen der Gene hTREK-1c und HO-1 (Kap. 2.2.1.10 und 2.2.1.11) in den Expressionsvektor für Oozyten pSGEM (Vektorkarte siehe Anhang) subkloniert. Dieser Vektor enthält die Bindungsstelle für die Phagen RNA-Polymerase T7 (T7-Promotor). Vor und hinter der multiplen Klonierungsstelle befinden sich die 5'-und 3'-nicht translatierten Regionen (UTR) des *Xenopus laevis* Gens β -Globin. Um lange Transkripte zu vermeiden, wird das pSGEM-Konstrukt mit dem Restriktionsenzym NheI linearisiert und mittels eines DNA-Purification Kits aufgereinigt. Die *in vitro*-Transkription wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ansatz für die <i>in vitro</i> -Transkription	
Komponente	Volumen (μ L)
2x NTP/cap	7,5
10x Reaktionspuffer	1,5
linearisierter Vektor (0,8 μ g)	4,5
Enzym Mix	1,5
Gesamt	15

Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C wurde die Qualität der cRNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Danach wurde die

synthetisierte cRNA durch Lithium-Chlorid-Präzipitation gefällt. Hierfür wurden dem gesamten Ansatz 19 µL LiCl und 22,5 µL RNase-freies H₂O zugefügt und dieser 30 min bei -20 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet mit 80%igem Ethanol (v/v) gewaschen und erneut 20 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol vollständig entfernt und das Pellet für 5 min bei 37 °C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µL RNase-freiem H₂O resuspendiert.

Per Agarosegelelektrophorese wurde die Qualität der cRNA erneut überprüft und die Konzentration spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Abschließend wurden die entsprechenden cRNA-Verdünnungen und Mischungen angesetzt, die für die Injektionen in die Oozyten verwendet wurden.

2.2.2 Elektrophysiologie

2.2.2.1 cRNA-Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Injektion wurden zunächst mit einem Mikropipettenpuller Glaskapillaren zu Mikropipetten gezogen. Um für die Oozyten einen möglichst atraumatischen Einstich zu gewährleisten, wurden alle Pipetten an einer Mikroschmiede auf einen einheitlichen Durchmesser von 8-10 µm gebracht.

An dem Injektionsplatz bestehend aus einem Mikroskop, einem Mikroinjektor und einem Mikromanipulator wurde die cRNA in die Mikropipette blasenfrei aufgesogen und durch einen definierten Injektionsschub in die Oozyte injiziert. Durch den Mikroinjektor wurde so pro Oozyte eine definierte Menge von 50 nL abgegeben. Die Menge an benötigter cRNA basierte dabei auf Erfahrungswerten und vorherigen Versuchsreihen. Nach erfolgter Injektion wurden die Oozyten bei 18 °C für 48 Stunden in ND 96 Aufbewahrungslösung geschwenkt.

ND 96 Puffer Aufbewahrungslösung	
Komponente	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl ₂	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	5 mM
in H ₂ O	pH 7,4
Natriumpyruvat	2,5 mM
Theophyllin	90 mg/L
Gentamycin	20 µg/L

2.2.2.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme von *Xenopus laevis* Oozyten

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnten die Oozyten mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) elektrophysiologisch charakterisiert werden. Der Messstand setzte sich aus Mikroskop, Referenzelektroden, Perfusionskammer mit Perfusionssystem, Verstärker mit Messelektroden, einem Analog/Digitalwandler und einem PC mit einer auf LabView basierenden Software zusammen. Als Messelektroden wurden Glaskapillaren verwendet, die mittels eines Mikropipettenpullers gezogen und mit 3 M KCl-Lösung befüllt wurden. Zwei Referenzelektroden in der Perfusionslösung waren direkt mit dem Verstärker verbunden. Die ND 96 Messlösung wurde in die Perfusionskammer eingeleitet, die mit einem Überlaufschutz versehen war.

Es wurde immer eine injizierte Oozyte in die Perfusionskammer überführt, die beiden Messelektroden wurden mit Hilfe des Mikroskops an der Oozytenmembran platziert. Dabei wurde das Haltepotential auf -80 mV geklemmt und eine Spannungsrampe gefahren (siehe Abb. 2.1). Der Stromverlauf wurde über die Zeit aufgezeichnet und die resultierenden Ströme bei jeweils 0 mV abgelesen und gespeichert.

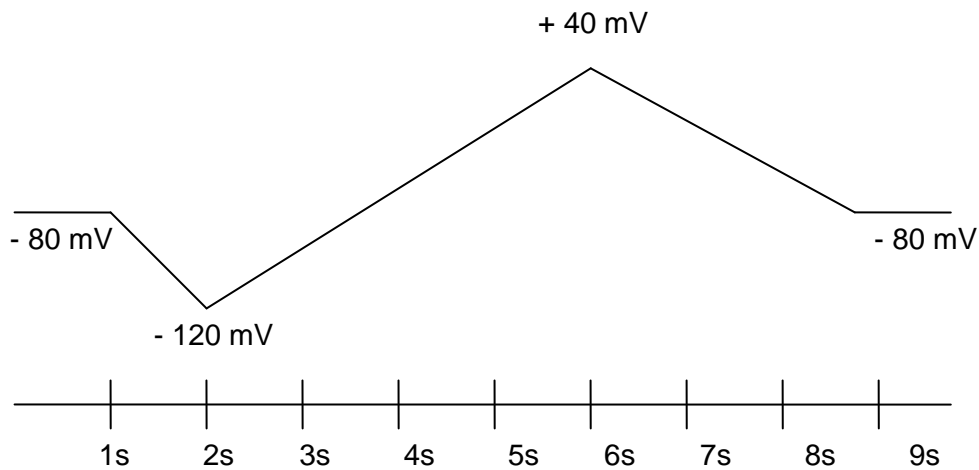


Abb. 2.1 Spannungsprotokoll zur TEVC bei hTREK-1 Kanälen.

ND 96 Puffer (10x)	
Komponente	Konzentration (mM)
NaCl	960
KCl	20
CaCl ₂	18
MgCl ₂	10
HEPES	50
in H ₂ O	
pH 7,4 mit NaOH einstellen	

2.2.2.3 Statistik

Die zu vergleichenden Datensätze wurden anhand des zweiseitigen, ungepaarten T-Tests auf signifikante Unterschiede überprüft. Der Test gibt Auskunft darüber, ob sich die Mittelwerte zweier Datensätze statistisch unterscheiden. Dabei gilt der p-Wert als Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit und wird mit zunehmender Signifikanz kleiner. Werte, die $< 0,05$ waren, galten als signifikant unterschiedlich und wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Werte kleiner als 0,01 müssen mit zwei Sternen (**) hochsignifikant, Werte kleiner als 0,001 müssen mit drei Sternen (***) höchstsignifikant markiert werden.

2.2.3 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Aufbewahrung der HeLa-Zellen erfolgte in Anzuchtflaschen unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C in Vollmedium.

HeLa Medium	
Komponente	Menge
DMEM	500 mL
FCS	10 % (v/v)
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL

2.2.3.1 Splitten von Zellkulturen

Zu Beginn wurde das Nährmedium der Zellen mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 mL PBS (Invitrogen) gewaschen und dann mit 2 mL 0,25%igem Trypsin für 3 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen besser vom Boden der Anzuchtflasche lösen. Im Anschluss daran wurde unter einem Mikroskop überprüft, ob sich die Zellen abgelöst hatten, dann wurde die Trypsinreaktion mit 7 mL Komplettmedium abgestoppt. Die Suspension wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 2 min bei 100 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder mittels Vakuumpumpe abgenommen und das Zellpellet konnte in 3 mL Komplettmedium resuspendiert werden. Zur Proteingewinnung aus HeLa-Zellen wurden diese in 6-Well-Platten überführt und mit Komplettmedium versetzt. Um neue Zellen auszusäen, wurden diese in gewünschter Verdünnung in eine mit Komplettmedium gefüllte Anzuchtflasche überführt.

2.2.3.2 Transiente Transfektion von Zellkulturen

Für die Expression von Proteinen in Säugerzellen wurde eine transiente Transfektion durchgeführt. Als Transfektionsreagenz diente dabei Lipofectamin. Am Tag zuvor wurden die Zellen in 6-Well-Platten eingesät. Als eine Konfluenz von 80 % gegeben war, konnte mit der transienten Transfektion begonnen werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und durch 4 mL DMEM mit FCS ersetzt und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für jeden Transfektionsansatz wurden 200 µL DMEM ohne Zusätze in zwei sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. In das eine wurde nun 8 µL Lipofectamin und in das andere 5 µg Plasmid-DNA gegeben, welches das gewünschte Gen beinhaltete. Beide Ansätze wurden gevortext und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt und für 15 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf die mit DMEM und FCS vorbereiteten Zellen gegeben. Das Medium wurde nach 4 Stunden gewechselt, die Zellen wurden für 48 h inkubiert.

2.2.4 Proteinbiochemie

2.2.4.1 Proteinisolierung aus HeLa-Zellen

48 Stunden nach der Transfektion der HeLa-Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und jeder Ansatz einmal mit 5 mL 1x PBS gewaschen. Nun wurde 1 mL PBS hinzugefügt und die Zellen auf Eis mit einem Zellschaber vom Boden der 6-Well-Platte gelöst. Anschließend wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL Triton X-100 Lysepuffer, der mit 10 µL Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt worden war, aufgenommen, resuspendiert und für 30 min bei 0 °C inkubiert. Danach wurde für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurde 2x SDS-Probenpuffer hinzugefügt und das Lysat für 5 min bei 95 °C denaturiert.

PBS (10x)	
Komponente	Konzentration
NaCl	1,37 M
KCl	26,8 mM
Na ₂ PO ₄	80 mM
KH ₂ PO ₄	14,7 mM

2x SDS Probenpuffer	
Komponente	Konzentration
TRIS/HCl, pH 6,8	125 mM
Glycerol	20% (v/v)
DTT	100 mM
SDS	4 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

Triton X-100 Lysepuffer	
Komponente	Konzentration
Triton X- 100	1 % (v/v)
NaCl	150 mM
TRIS	50 mM
pH = 7,5 einstellen	
Protease Inhibitor Cocktail	10 µL/mL

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. SDS geht eine Bindung mit allen Proteinen ein und nivelliert durch seine stark negative Ladung alle Ladungen der Proteine, so dass die Eiweiße lediglich nach ihrem Molekulargewicht und nicht anhand ihrer Ladung aufgetrennt werden. Für die Herstellung der Gele wurde zunächst eine Vorrichtung aufgebaut in der das Gießen selbiger exakt möglich ist. Das Entfetten der Glasplatten, das Anbringen der Silikondichtung und das Einspannen der Glasplatten schlossen sich an. Jetzt wurde das Trenngel hergestellt und bis zwei Zentimeter unterhalb der Kante der kürzeren Glasplatte eingefüllt und mit Isopropanol

überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Gelkamm zur Bildung der Taschen eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden der Gelkamm und die Silikondichtung entfernt, das fertige Polyacrylamidgel in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit einfach konzentriertem Elektrodenpuffer aufgefüllt. Die Geldaschen wurden mit den entsprechenden proteinhaltigen Zelllysaten beladen, die vorher 1:1 mit zweifach konzentriertem SDS Probenpuffer versetzt worden waren. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurde ein Proteinlängenstandard aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 200 mV und einer Stromstärke von 35 mA für ein Gel, bzw. 50 mA für zwei Gele für 50 min.

Trenngel		
Komponente	Konzentration	
	10%ig	12%ig
30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid	3,33 mL	4 mL
H ₂ O	3,2 mL	2,53 mL
Sammelgelpuffer	3,33 mL	3,33 mL
10 % SDS (w/v)	100 µL	100 µL
APS	50 µL	50 µL
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	10 µL	10 µL

Sammelgel (4%ig)	
Komponente	Konzentration
30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid	1,33 mL
H ₂ O	6,57 mL
Sammelgelpuffer	2 mL
10 % SDS (w/v)	100 µL
APS	100 µL
TEMED	10 µL

10x Elektrodenpuffer	
Komponente	Konzentration
TRIS	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (w/v)
pH 8,3 mit NaOH einstellen	

2.2.4.3 Westernblot nach der Fluoreszenz-Methode

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden unter semi-trockenen Bedingungen auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Spannung von 50 mA für 80 min geblottet. Die in der Abbildung grün dargestellten Filterpapiere wurden mit Blotting Puffer durchtränkt (siehe Abb. 2.2).

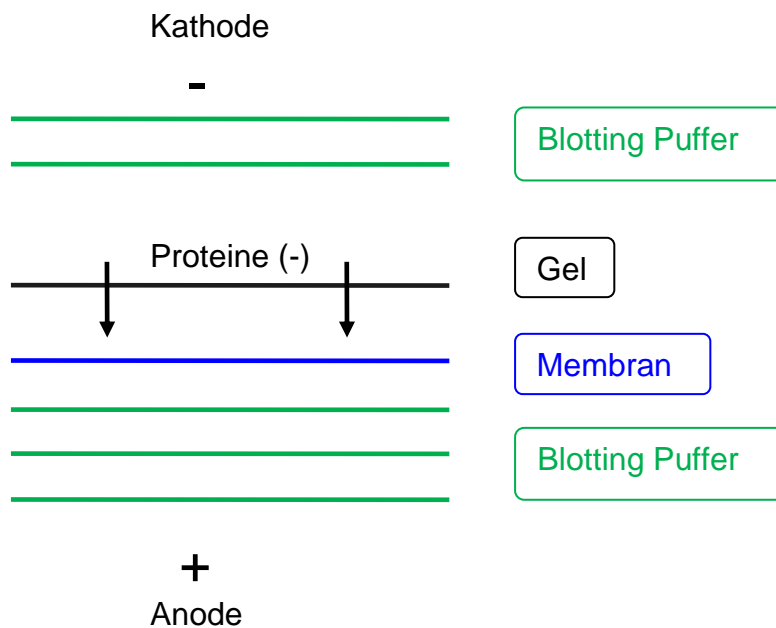


Abb. 2.2 Aufbau der Blotvorrichtung.

Ponceau S-Lösung	
Komponente	Konzentration
Essigsäure	1 % (v/v)
Ponceau S	0,5 % (w/v)
in H ₂ O	

Blotting Puffer	
Komponente	Menge (g)
TRIS	5,82
Glycin	2,93
SDS	0,375
200 mL Methanol	
mit Aqua dest auf 1 L auffüllen	

Mit einer Ponceau S-Färbung konnte dann die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran überprüft werden. Dafür wurde die Membran in 5 mL Ponceau S-Lösung geschwenkt. Bei erfolgreichem Transfer wurden die Proteine durch Rotfärbung sichtbar. Die Membran wurde fotografiert und zur Dokumentation gespeichert. Durch mehrmaliges Waschen mit H₂O wurde die Ponceau S-Lösung wieder entfernt. Nun wurde die Membran für 2 h in einer Roti-Block-Lösung (Roti[®]-Block, 1:10 verdünnt in PBS (PBS siehe 2.2.4.1)) inkubiert, damit unspezifische Bindungsstellen der Proteine blockiert wurden. Im Anschluss folgte die einstündige Inkubation mit dem 1:1000 in Roti-Block-Lösung verdünntem Erstantikörper. Es schloss sich eine dreimalige Waschung à 10 min mit Roti-Block-Lösung an. Als nächstes erfolgte die einstündige Inkubation des in Roti-Block-Lösung verdünnten Zweitantikörpers unter Lichtausschluss. Der Zweitantikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden, der bei einer Wellenlänge zwischen 680 und 800 nm im nahen Infrarotbereich fluoresziert. Anschließend wurde dreimal mit Roti-Block-Lösung für je 10 min gewaschen. Die Auswertung fand mit der Odyssey Sa Express Software der Firma LI-COR und dem dazugehörigen Gerät statt. Es ist in der Lage ist den fluoreszierenden Farbstoff zu detektieren und dadurch die Banden im Westernblot sichtbar zu machen. Zu Dokumentationszwecken wurden die Westernblots gespeichert.

2.2.5 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Um direkte Interaktionen von integralen Membranproteinen oder membran-assoziierten Proteinen in Hefe nachzuweisen, wurde ein spezielles Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet, das sogenannte „Split Ubiquitin Yeast-Two Hybrid Membrane Protein Kit“ der Firma MoBiTec (Abb. 2.3). Dieses System nutzt die Beobachtung, dass das Protein Ubiquitin in zwei Segmente (C-terminal (Cub) und N-terminal (Nub)) aufgetrennt werden kann, die nach gemeinsamer Expression in einer Zelle wieder zu einem „geteilten“ (split) Ubiquitin zusammenfinden. Durch eine Punktmutation im Nub-Segment (NubG) des Ubiquitins wurde die hohe Affinität zu dem Cub-Segment komplett zerstört, was eine spontane Zusammenlagerung beider Segmente verhindert. Die beiden Ubiquitinsegmente liegen in diesem System in zwei unterschiedlichen Vektoren vor: dem Ködervektor pBT3-N (**B**ait), welcher das Cub-Segment beinhaltet, und dem Beutevektor pPR3-N (**P**rey), welcher das NubG-Segment beinhaltet. Die kodierenden DNA-Regionen der Proteine, deren Interaktionen untersucht werden sollten, wurden mit den C-terminalen Enden der jeweiligen Ubiquitinsegmente in den Vektoren pBT3-N und pPR3-N fusioniert. Dazu wurde die kodierende DNA-Region der HO-1 in den Beutevektor pPR3-N kloniert. Die Ködervektoren pBT3-N mit den kodierenden DNA-Regionen der interessierenden Ionenkanalproteine lagen bereits vor. Zur Untersuchung der Interaktionen werden beide entsprechend vorbereitete Vektoren, pBT3-N und pPR3-N, in kompetente Hefezellen NMY51 transformiert und kultiviert. Dabei kommt es zur Expression der NubG- und Cub-Fusionsproteine.

Der Ködervektor (pBT3-N) kodiert neben dem Cub-Segment auch für einen artifiziellen Transkriptionsfaktor-Komplex (TF-Komplex), der sich aus der LexA DNA-bindenden Domäne und dem *Herpes simplex* VP16 Transaktivator zusammensetzt und N-terminal an das Cub-Segment fusioniert ist. Kommt es aufgrund einer starken Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine zu einer dichten Annäherung der NubG- und Cub-Segmente, formiert sich ein „geteiltes“ (split) Ubiquitinprotein, das von der Ubiquitin spezifischen Protease (UBP) erkannt werden kann. Die UBP spaltet dann den an Cub angehefteten TF-Komplex ab, der nach Translokation in den Zellkern die Aktivierung der Transkription der Reportergene *His3*, *Ade* und *lacZ* bewirkt. Die Hefezelle ist

bei einer Interaktion der beiden Proteine in der Lage Histidin und Adenin zu synthetisieren und auf einem Selektionsmedium, dem kein Histidin und Adenin zugesetzt wurde, zu wachsen. Außerdem wird nun in der Hefe das Enzym β -Galaktosidase (kodiert von dem *lacZ*-Gen) gebildet, dessen Aktivität in einem Nachweistest (X-Gal Assay) durch Blaufärbung der Hefezellen gezeigt werden kann.

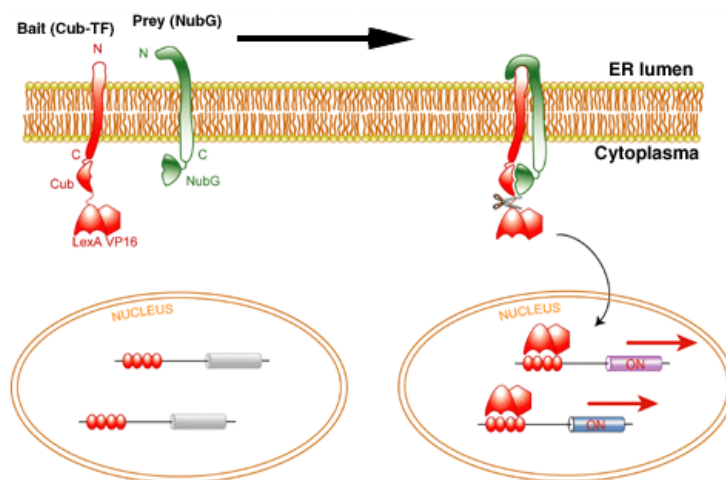


Abb. 2.3 Interaktion von Bait und Prey.

Schematische Darstellung der Fusion von Cub und Nub, Abspaltung des Reporterprotein-Komplex und Aktivierung der Gene *lacZ* und *His3* im Nukleus. [Darstellung nach MoBiTec]

2.2.5.1 Hefe-Transformation

Zunächst wurden 50 mL YPAD-Medium mit einem Hefeklon des Stammes NMY51 angeimpft und bei 30 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Übernachtskultur wurde am darauf folgenden Tag 50 mL frisches YPAD-Medium auf eine optische Dichte (OD) von 0,2 bei 546 nm eingestellt und solange bei 30 °C inkubiert, bis die OD 0,6 erreicht war. Danach wurde die Hefekultur für 15 min bei 2500 g zentrifugiert und das Hefepellet in 2,5 mL autoklaviertem Wasser resuspendiert. Für die Transformation wurde der PEG/LiAc Mastermix angesetzt:

PEG/LiOAc Master Mix für den Transformationsansatz	
Komponente	Menge (µL)
PEG (50 %)	240
LiOAc	36
denaturiertes Lachssperma	25

Nun wurden 100 µL der Hefe-Suspension, 300 µL des Master Mix und 0,5 µg der Plasmid-DNA des Köderproteins und des Beuteproteins in ein Reaktionsgefäß gegeben, für 20 s gevortext und dann für 45 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einem kurzen Abzentrifugieren für 5 min bei 400 rpm wurde das Hefepellet in 100 µL 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert, auf Leucin- und Tryptophanfreien SD-Minimalmediumplatten (–LW-Platten) ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Hefekolonien, die auf den –LW-Platten wachsen können, beinhalten beide Plasmid-DNAs, die transformiert wurden.

YPAD- Medium	
Komponente	Konzentration
YPD Medium	50 g/L
Adeninsulfat	40 mg/L

SD-Medium		
	SD-LW	SD-LWHA
SD Minimal Medium	27 g/L	27 g/L
Dropout Mix	640 mg/L	600 mg/L
SD-Platten		
+ Agarose	15 g/L	15 g/L

2.2.5.2 Hefe-Spotting

Um zu testen, ob die Interaktion zweier Proteine stattgefunden hat, wurden fünf voneinander unabhängige Hefeklone, die auf einer –LW-Platte gewachsen waren, zusätzlich auf eine Leucin-, Tryptophan-, Histidin- und Adenin-freie SD-Minimalmediumplatte (–LWHA-Platten) gespottet. Dazu wurde jeweils ein Klon von der –LW-Platte in 50 µL 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und davon 2,5 µL punktförmig jeweils auf einer neuen –LW-Platte (Kontrolle) und –LWHA-Platte pipettiert und für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.5.3 X-Gal Assay

Durch die Protein-Proteininteraktion werden neben den Genen, die für Histidin und Adenin kodieren, unter anderem auch das *lacZ*-Gen angeschaltet, welches für das bakterielle Enzym β -Galaktosidase kodiert. Wird dieses Enzym in der Hefe gebildet, kann es in einem X-Gal Assay durch Blaufärbung nachgewiesen werden. Für den Versuch wurden die Hefekolonien auf Filterpapier gestempelt und für 5 min in flüssigem Stickstoff fixiert. Danach wurden die Filterpapiere fünf Minuten in Petrischalen aufgetaut und darin mit einer Mischung aus X-Gal (0,01%ig, (w/v)) und Agarose (0,5%ig, (w/v)) gelöst in 1x PBS überschichtet. Nach einer Stunde konnte anhand der Blaufärbung eine Aussage über die Interaktion getroffen werden. Zu Dokumentationszwecken wurde die überschichtete Platte eingescannt und gespeichert.

3. Ergebnisse

3.1 Direkte Interaktion von hTREK-1c und anderen K_{2P}-Kanälen mit Hämoxygenase-1 und Hämoxygenase-2 im Hefe-zwei-Hybrid-System

Die Aktivität der TREK-1-Kanäle wird durch verschiedenste chemische und physikalische Faktoren reguliert. Auch die Interaktion mit anderen Proteinen kann die Aktivität dieser Kanäle beeinflussen. Es wurde kürzlich gezeigt, dass TREK-1 und auch andere K_{2P}-Kanäle mit dem Enzym Hämoxygenase-2 (HO-2) interagieren. Für die Spleißvariante TREK-1c ergaben die Untersuchungen eine funktionelle Interaktion mit HO-2, die eine Steigerung der Kanalaktivität zur Folge hat (Koschinsky, 2010). Neben der konstitutiv exprimierten HO-2 ist auch die induzierbare Isoform Hämoxygenase-1 (HO-1) bekannt, die beide eine 45%ige Identität und eine 76%ige Similarität auf Ebene der Aminosäuresequenzen haben. Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob die Interaktion von TREK-1c und anderen K_{2P}-Kanälen mit HO-2 spezifisch für diese Isoform ist oder ob auch die Isoform HO-1 mit TREK-1c und anderen K_{2P}-Kanälen interagieren kann. Zur Untersuchung der Interaktionen wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-Membranprotein-System (MoBiTec) verwendet, mit welchem Interaktionen von integralen Membranproteinen untersucht werden können. Dazu wurde die kodierende Region von HO-1 in den Beutevektor pPR3-N kloniert. Die Ködervektoren, die die kodierenden Regionen von TREK-1c und anderen K_{2P}-Kanälen enthielten und der Beutevektor mit der kodierenden Region von HO-2 lagen bereits vor. Bei Anwendung der Methode der direkten Interaktion von Membranproteinen im Hefe-zwei-Hybrid-System (Split-Ubiquitin System) führt eine Interaktion zwischen zwei Proteinpartnern dazu, dass die beiden getrennten Ubiquitinsegmente, Cub und NubG, zusammengeführt werden. Die darauf folgende Freisetzung des Transkriptionsfaktor-Komplexes (TF-Komplex) bewirkt die Aktivierung bestimmter Reportergene (z. B. *His3* oder *lacZ*), die es den Hefezellen ermöglicht Histidin zu synthetisieren und auf Histidin freien SD-LWHA Platten zu wachsen. Eine Aktivierung des Gens *lacZ* führt zur Bildung des Enzyms β -Galaktosidase, welches durch Blaufärbung im X-Gal Assay nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe dieser beiden Reporterproteine

kann eine Protein-Proteininteraktion zum einen durch das Wachsen der Hefezellen auf SD-LWHA Platten nachgewiesen werden, zum andern mittels X-Gal Assay gezeigt werden.

3.1.1 Untersuchung der Interaktionen von hTREK-1 Spleißvarianten mit HO-1 und HO-2

Da für die drei aminoterminalen Spleißvarianten des humanen TREK-1 Interaktionen mit HO-2 nachgewiesen werden konnten, wurden mögliche Interaktionen von TREK-1a, -b und -c mit der Isoform HO-1 im Hefe-zwei-Hybrid-System getestet. Es sei angemerkt, dass in jedem Experiment das Wachstum von fünf voneinander unabhängigen Hefekolonien auf den in Abb. 3.1 angegebenen Selektionsmedien (SD-LW- und -LWHA) untersucht wurde und ein X-Gal Assay durchgeführt wurde. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt. Abb. 3.1 zeigt repräsentativ für jede Kombination das Wachstum einer transformierten Hefekolonie auf den Selektionsmedien SD-LW und SD-LWHA und das Ergebnis des X-Gal Assays.

Das Wachstum der Kolonien in Spalte -LW (Abb. 3.1) zeigt, dass bei allen Kombinationen von TREK-1 und Hämoxygenasen (HO-1 und HO-2) beide Vektorkonstrukte (pBT3-N und pPR3-N) transformiert waren. Spalte -LWHA zeigt, dass bei allen Kombinationen von TREK-1 mit HO-1 kein Wachstum der Hefekolonien auf dem Selektionsmedium SD-LWHA stattgefunden hat. Hingegen zeigen alle Kombinationen von TREK-1 mit HO-2, die als Positivkontrollen in diesem Experiment dienten, ein Wachstum der Hefekolonien auf dem Selektionsmedium SD-LWHA. Der X-Gal Assay, dessen Ergebnis in der Spalte X-Gal (Abb. 3.1) dargestellt ist, bestätigt die zuvor gemachte Beobachtung des Wachstumsverhaltens auf dem Selektionsmedium SD-LWHA.

Für die Spleißvarianten TREK-1a, -b und -c konnte keine direkte Interaktion mit der Isoform HO-1 nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen den TREK-1 Spleißvarianten und HO-2 scheint somit spezifisch für diese Isoform der Hämoxygenasen zu sein.



















	- LW	-LWHA	X-Gal
hTREK-1a + hHO-1			
hTREK-1a + hHO-2			
hTREK-1b + hHO-1			
hTREK-1b + hHO-2			
hTREK-1c + hHO-1			
hTREK-1c + hHO-2			

Abb. 3.1 Untersuchung der Interaktion von TREK-1 Spleißvarianten mit HO-1 und HO-2.

hTREK-1a, -b oder -c (alle in pBT3-N) und HO-1 oder HO-2 (alle in pPR3-N) wurden in die Hefezellen transformiert und auf SD-LW Platten bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden fünf voneinander unabhängige Hefekolonien auf SD-LW Platten (-LW) und auf SD-LWHA Platten (-LWHA) gespottet und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Hefekolonien der SD-LWHA Platten wurden dann im X-Gal Assay (X-Gal) untersucht. Es ist jeweils nur eine Hefekolonie exemplarisch dargestellt.

3.1.2 Untersuchung der Interaktion weiterer K_{2P} -Kanäle mit HO-1 und HO-2

In vergangenen Experimenten konnten Interaktionen auch für weitere K_{2P} -Kanäle mit HO-2 nachgewiesen werden (Koschinsky, 2010). Nun wurden mögliche Interaktionen mit den K_{2P} -Kanälen TREK-2c und TASK-1 sowohl mit der Isoform HO-1 als auch mit HO-2 getestet. Hierbei wurde ebenfalls in jedem Experiment das Wachstum von fünf voneinander unabhängigen Hefekolonien auf den in Abb. 3.2 angegebenen Selektionsmedien (SD-LW und SD-LWHA) untersucht und ein X-Gal Assay durchgeführt. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. In Abb. 3.2 wird repräsentativ für jede Kombination das Wachstum von einer transformierten Hefekolonie auf den Selektionsmedien SD-LW und SD-LWHA und das Ergebnis des X-Gal Assays gezeigt.

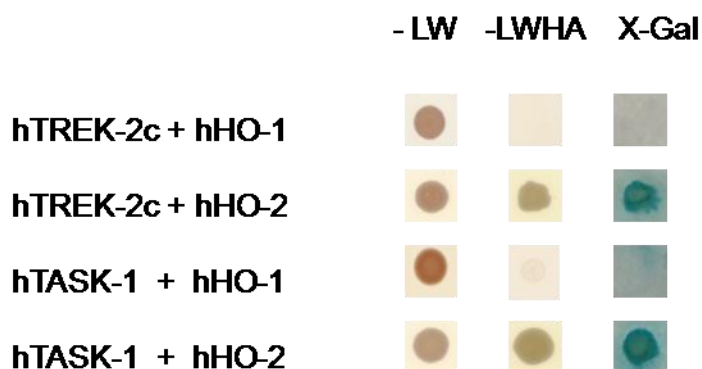


Abb. 3.2 Untersuchung der Interaktion weiterer K_{2P} -Kanäle mit HO-1 und HO-2.

hTREK-2c und hTASK-1 (beide in pBT3-N) und HO-1 oder HO-2 (beide pPR3-N) wurden in die Hefezellen transformiert auf SD-LW Platten inkubiert und anschließend das Wachstumsverhalten einzelner Kolonien auf SD-LW und -LWHA Platten getestet. Die Kolonien der SD-LWHA Platten wurden dann im X-Gal Assay (X-Gal) untersucht. Es ist jeweils nur eine Hefekolonie exemplarisch dargestellt.

Die Spalte –LW (Abb. 3.2) zeigt das Wachstum der Kolonien aller Kombinationen der K_{2P} -Kanäle TREK-2c und TASK-1 mit HO-1 und die Kombination von TREK-2c und TASK-1 mit HO-2. Bei allen Kombinationen waren also beide Vektorkonstrukte (pBT3-N und pPR3-N) transformiert worden. Spalte –LWHA zeigt, dass bei allen K_{2P} -Kanälen mit HO-1 kein Wachstum der Hefekolonien auf dem Selektionsmedium SD-LWHA stattgefunden hat. Bei der Kombination von TREK-2c und HO-2, sowie TASK-1 und HO-2, fand Wachstum der Hefekolonien auf dem Selektionsmedium SD-LWHA statt. In der Spalte X-Gal ist das Ergebnis des X-Gal Assays dargestellt. Hier bestätigt sich das Wachstumsverhalten auf dem Selektionsmedium SD-LWHA. Für den K_{2P} -Kanal TREK-2c und den säuresensitiven K_{2P} -Kanal TASK-1 konnte keine direkte Interaktion mit der Isoform HO-1 nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen den K_{2P} -Kanälen TREK-2c und TASK-1 mit HO-2 scheint somit spezifisch für diese Isoform der Hämoxygenasen zu sein.

3.1.3 Direkte Interaktion des Kir2.1 mit HO-1 und HO-2

Um der Frage nachzugehen, ob die negative Interaktion von Hämoxxygenase-1 spezifisch an K_{2P}-Kanäle gebunden ist, wurde im nächsten Ansatz der humane Kir2.1 Kanal getestet, der zu der Einwärtsgerichteter Kaliumkanalfamilie gehört (siehe Kapitel 1.1). Der Beutevektor pBT3-N-Kir2.1 wurde von Dr. V. Renigunta zur Verfügung gestellt. Die korrekte Anordnung des Kir2.1 Kanals in der Membran wurde durch die Coexpression von pBT3-N-Kir2.1 mit den Kontrollvektoren bestätigt (Abb. 3.3). Als Positivkontrolle wurde der Beutevektor pBT3-N-Kir2.1 mit dem Vektor pAl-Alg5 (MoBiTec) in die Hefezellen cotransformiert. Der Vektor pAl-Alg5 kodiert ein Fusionsprotein, das aus dem Hefe ER-Protein Alg5 und dem Hefe Nubl-Ubiquitinsegment besteht. Dieses Fusionsprotein interagiert aufgrund der hohen Affinität des Nubl-Segments zu dem Cub-Segment mit dem Fusionsprotein LexA-VP16-Cub-Kir2.1 (vom Beutevektor kodiert) und es formiert sich das „split“-Ubiquitin. Wenn das Beuteprotein Kir2.1 in der richtigen Orientierung in die Membran eingebaut ist, kann der zytosolisch lokalisierte TF-Komplex, LexA-VP16, durch UBP freigesetzt und nachfolgend die Transkription der Reportergene *His3* und *lacZ* aktiviert werden. Die Hefezellen können dann auf dem Selektionsmedium SD-LWHA wachsen (siehe Kapitel 2.2.5). Als Negativkontrolle wurde der Vektor pDL2-Alg5 (MoBiTec) verwendet, welcher für ein Fusionsprotein kodiert, das aus dem Hefe ER-Protein Alg5 und dem mutierten NubG-Ubiquitinsegment aus der Hefe besteht. Das NubG-Segment kann aufgrund der Mutation nicht mehr mit dem Cub-Segment interagieren mit der Folge, dass sich kein „split“-Ubiquitin formieren kann und die weiter oben beschriebenen Aktivierungsprozesse der Reportergene nicht stattfinden können. Bei diesem Experiment sollten die Hefezellen nicht mehr auf dem Selektionsmedium SD-LWHA wachsen können.

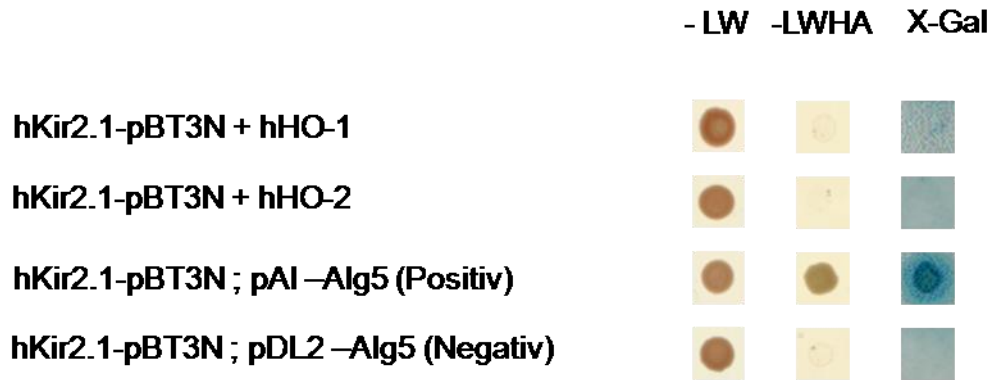


Abb. 3.3 Untersuchung der Interaktion von Kir2.1 mit HO-1 und HO-2.

Kir2.1 (pBT3-N) und HO-1 und HO-2 (beide pPR3-N) wurden in die Hefezellen transformiert, auf SD-LW Platten inkubiert und anschließend das Wachstumsverhalten einzelner Kolonien auf SD-LW und -LWHA Platten getestet. Des Weiteren wurden beide Konstrukte mit einer Positivkontrolle pAI-Alg5 und einer Negativkontrolle pDL2-Alg5 getestet. Die Kolonien der SD-LWHA Platten wurden dann im X-Gal Assay (X-Gal) untersucht. Es ist jeweils nur eine Hefekolonie exemplarisch dargestellt.

Die Untersuchungen des Beutevektors pBT3-N-Kir2.1 mit der Positiv- und Negativkontrolle ergaben (Abb. 3.3), dass das Beuteprotein Kir2.1 in der richtigen Orientierung in die Membran eingebaut wurde.

Die Cotransformation des Beutevektors pBT3-N-Kir2.1 mit den Ködervektoren pPR3-N-HO-1 und -HO-2 zeigte in beiden Fällen kein Wachstum der Hefekolonien auf dem Selektionsmedium SD-LWHA und auch keine Blaufärbung nach Durchführung des X-Gal Assays. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass keine direkte Interaktion zwischen Kir2.1 und HO-1 oder -2 stattfindet.

3.2 Strommessungen von hTREK-1c unter dem Einfluss von HO-1 und HO-2 in Oozyten aus *Xenopus laevis*

Die Untersuchungen zur direkten Interaktion von HO-1 mit verschiedenen K_{2P} -Kanälen ergaben, dass HO-1, im Unterschied zu HO-2, mit keinem der untersuchten Kanäle interagiert. Die funktionelle Interaktion von TREK-1c mit HO-2 wurde bereits durch eine Aktivierung des Ionenkanals nach gemeinsamer Expression beider Proteine in *X. laevis* Oozyten nachgewiesen (Koschinsky, 2010). Aus diesen Ergebnissen wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die Interaktion beider Proteinpartner (TREK-1c und HO-2) an

der Zellmembran dazu führt, dass die lokale Konzentration des HO-2 Reaktionsproduktes Kohlenmonoxid (CO) ansteigt und diese zu einer Aktivierung des Ionenkanals führt. Aufgrund der Tatsache, dass bei beiden Isoformen der Hämoxxygenase (HO-1 und HO-2) CO als Reaktionsprodukt anfällt, sollte untersucht werden, ob bei Coexpression von TREK-1c mit HO-1 ebenfalls eine Kanalaktivierung auftritt.

Mittels *in vitro*-Transkription wurde zunächst cRNA von hTREK-1c, HO-1 und HO-2 hergestellt. Nach Coinjektion der cRNAs von hTREK-1c und HO-1 oder HO-2 in *X. laevis* Oozyten sollten die funktionellen Auswirkungen auf den K₂P-Kanal untersucht werden. Dazu wurden elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) durchgeführt. Dabei wurde das Membranpotential auf -80 mV geklemmt, eine neun Sekunden andauernde Spannungsrampe von -120 mV bis +40 mV gefahren und die Stromamplitude der Oozyten bei 0 mV abgelesen (siehe Abb. 3.4 a). Die gemessenen Ströme wurden auf hTREK-1c normiert.

Abbildung 3.4 b zeigt deutlich, dass die Coexpression von hTREK-1c mit HO-1 keine signifikante Erhöhung des Stroms bewirkt. Dagegen führt Coexpression von hTREK-1c mit HO-2, welche als direkte Interaktionspartner im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert werden konnten, zu einer signifikanten Erhöhung des hTREK-1c Stroms um 20 %. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass zum einen die HO-1 keinen funktionellen Einfluss auf TREK-1c ausübt und dass zum anderen hTREK-1c funktionell durch die HO-2 beeinflusst wird, was vermutlich auf die lokale Erhöhung der CO-Konzentration zurück zu führen ist.

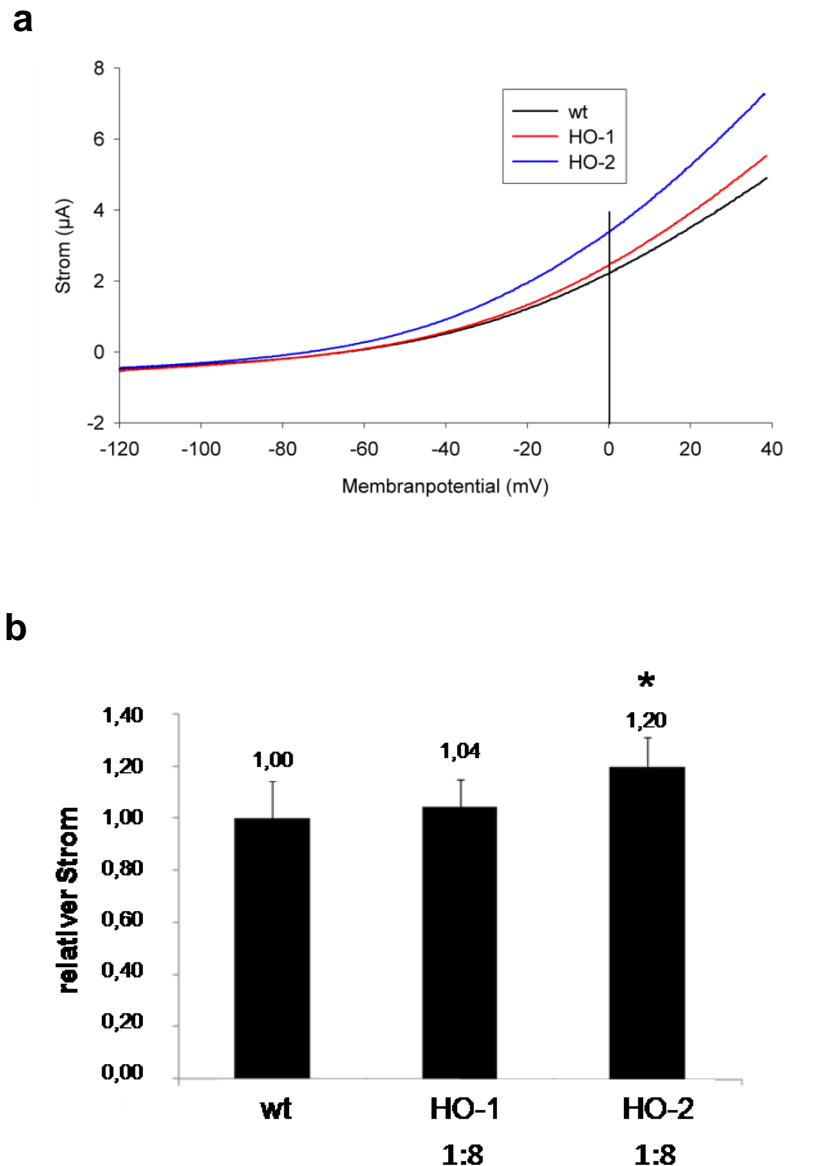


Abb.3.4

a Strom-Spannungskurve von hTREK-1c unter dem Einfluss von HO-1 und HO-2.

Es ist exemplarisch eine Messung eines Messtages dargestellt. Die schwarze Linie (wt = Wildtyp) zeigt die Strom-Spannungskurve von hTREK-1c, die rote Linie zeigt die Strom-Spannungskurve von hTREK-1c nach Coexpression mit HO-1 und die blaue Strom-Spannungskurve von hTREK-1c nach Coexpression mit HO-2.

b TEVC-Messungen von hTREK-1c nach Coexpression mit HO-1 oder HO-2 in *X. laevis* Oozyten.

Es wurden je 12 *X. laevis* Oozyten an sechs unabhängigen Messtagen gemessen und auf die Stromamplitude von hTREK-1c normiert. Je Oozyte wurden 1,5 ng hTREK-1 cRNA injiziert und bei den Coinjektionen zusätzlich 20 ng HO-1 oder HO-2 (Mengenverhältnis=1:8). 48 Stunden nach den Injektionen wurde die Stromamplitude des Auswärtsstroms der Oozyten gemessen. Die Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen T-Test bestimmt.

3.3 Aminoterminaler Fusion eines Hämagglutinin-Epitops mit hTREK-1c

Ziel war es, das Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) aminoterminal mit hTREK-1c (vorliegend in pcDNA3.1) zu fusionieren, damit nach heterologer Expression des Konstruktes in der Säugertierzelllinie HeLa ein spezifischer immunologischer Nachweis mit HA-Antikörpern möglich ist. Dazu wurde die DNA-Sequenz des HA-Epitops in die hTREK-1c-Sequenz mittels ortsgerichteter Mutagenese eingefügt.

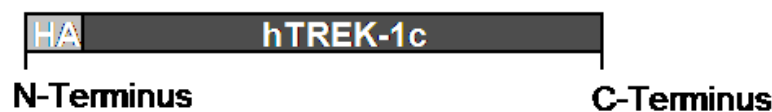


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der Fusion des HA-Epitops mit hTREK-1c.

Das Konstrukt HA-hTREK-1c liegt in dem Vektor pcDNA3.1 vor. Die dargestellten Längen sind übersichtshalber nicht verhältnismäßig zueinander dargestellt.

Die sich anschließenden Sequenzanalysen zeigten, dass die aminoterminaler Fusion des HA-Epitops an den offenen Leserahmen der hTREK-1c-Sequenz gelungen war. Abbildung 3.5 zeigt schematisch das rekombinante Fusionsprotein HA-hTREK-1c.

Im nächsten Schritt wurde das neu konstruierte Plasmid pcDNA3.1-HA-hTREK-1c in HeLa-Zellen transfiziert und exprimiert. Zum Vergleich wurden auch mit Wildtyp pcDNA3.1-hTREK-1c (dieses Plasmid war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden) transfizierte HeLa-Zellen und nicht transfizierte HeLa-Zellen unter gleichen Bedingungen inkubiert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen der drei Ansätze geerntet und die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Proteine der Zelllysate in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.

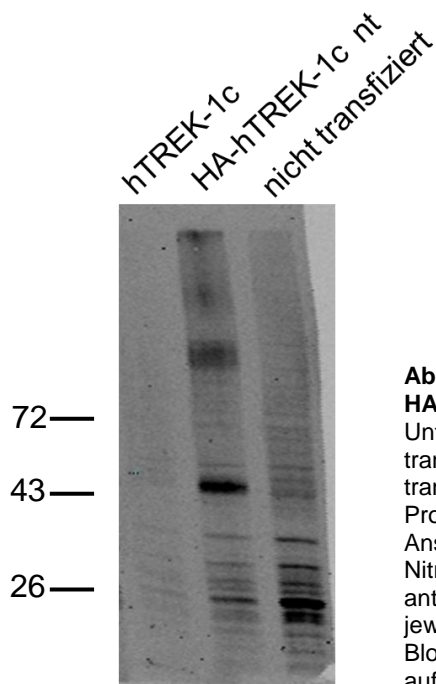


Abb. 3.6 Westernblot mit N-terminal in hTREK-1c eingefügtem HA-Epitop.

Untersucht wurden Triton X100-Lysate von HeLa Zellen transfiziert mit hTREK-1c-Konstrukten in pcDNA3.1 und nicht transfizierte Zellen als Negativkontrolle. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel. Anschließend wurden die Proteine mittels Westernblot auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit HA-Antikörpern und anti-Ratte IR Dye Sekundärantikörpern detektiert. Es wurden jeweils 20 µL der Gesamtzelllysate aufgetragen. Links neben dem Blot sind die Molekulargewichte einiger Proteine des mit aufgetragenen Längenstandards dargestellt (in kDa).

Abbildung 3.6 zeigt in Spur „hTREK-1c“ und Spur „nicht transfiziert“, dass die HA-Antikörper einige Proteine der Zelllysate unspezifisch detektieren, die in zukünftigen Experimenten als unspezifischer Hintergrund gewertet werden können. In Spur zwei „HA-hTREK-1c nt“ wird hochspezifisch ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 48 kDa detektiert, das dem erwarteten Molekulargewicht (MWG) des Fusionsproteins HA-hTREK-1c entspricht (erwartetes MWG von hTREK-1c ist 46,8 kDa und vom fusionierten HA-Epitop 1,2 kDa). Daraus ist zu schließen, dass die HA-Antikörper das Epitop in dem HA-hTREK-1c Fusionsprotein spezifisch detektieren können.

3.4 Carboxyterminale Fusion des Proteins EGFP mit hTREK-1c

Zur carboxyterminalen Einführung des EGFP in hTREK1-c musste zunächst das Stop-Codon des hTREK-1c zerstört werden, damit beide Sequenzen nach Fusion einen offenen Leserahmen haben. Dazu wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese das Stop-Codon des hTREK-1c durch die Aminosäure Glycin ersetzt. Anschließend wurde die kodierende Region von hTREK-1c in den richtigen offenen Leserahmen des EGFP im Vektor pEGFP-N1 (Vektorkarte siehe Anhang) kloniert.

Die korrekte Fusion von hTREK-1c mit EGFP wurde durch Sequenzanalysen bestätigt. Abbildung 3.7 zeigt schematisch das rekombinante Fusionsprotein hTREK-1c-EGFP.

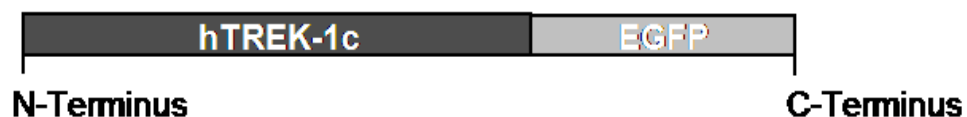


Abb. 3.7 Schematische Darstellung der Fusion des EGFP mit dem Carboxyterminus des hTREK-1c.
Die dargestellten Längen sind übersichtshalber nicht verhältnismäßig zueinander dargestellt.

Das neu konstruierte Plasmid hTREK-1c-pEGFP-N1 wurde anschließend in HeLa-Zellen transfiziert und exprimiert. Zum Vergleich wurden auch mit pEGFP-C1 (Clontech) transfizierte HeLa-Zellen, mit rTREK-1a-pEGFP-C1 (dieses Plasmid war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden) transfizierte HeLa-Zellen und nicht transfizierte HeLa-Zellen unter gleichen Bedingungen inkubiert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen der vier Ansätze geerntet und die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Proteine der Zelllysate in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert.

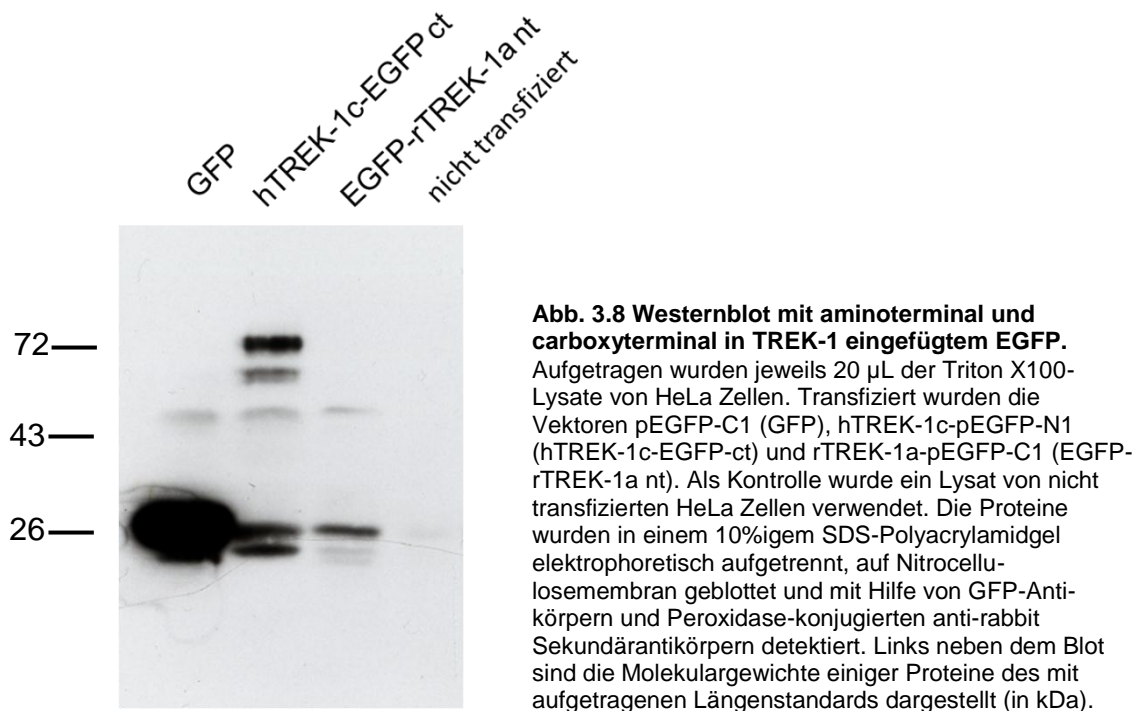


Abbildung 3.8 zeigt, dass die EGFP-Antikörper ihr Antigen, das „enhanced green fluorescent protein (EGFP)“ in der Spur „GFP“, die als Positivkontrolle dienen sollte, sehr spezifisch erkennen. Die Spur „nicht transfiziert“ zeigt, dass es zu keinen unspezifischen Anfärbungen von Proteinen der HeLa-Zellen kommt. In der Spur „hTREK-1c-EGFP ct“ wird hochspezifisch ein Protein mit einem Molekulargewicht (MWG) von etwa 74 kDa detektiert, das dem erwarteten MWG des Fusionsproteins hTREK-1c-EGFP entspricht (erwartetes MWG von hTREK-1c ist 46,8 kDa und von EGFP 26,9 kDa). Die auftretenden kleineren Proteinbanden könnten Produkte des hTREK-1c-EGFP Konstruktes sein, die durch z. B. alternative Translationsinitiation (ATI) gebildet wurden. In der Spur „EGFP-rTREK-1a nt“ wurde kein Protein mit dem erwarteten MWG von etwa 74 kDa detektiert. Lediglich eine schwächere Anfärbung eines Proteins mit einem MWG von etwa 27 kDa ist sichtbar, die auf EGFP hindeutet. Die Ergebnisse zeigen, dass die GFP-Antikörper zumindest das carboxyterminale Fusionsprotein hTREK-1c-EGFP sehr spezifisch detektieren können.

4. Diskussion

Der mechanosensitive K_{2P} -Kanal TREK-1 wird durch eine Vielzahl an physikalischen und chemischen Reizen reguliert. Er fällt durch seine starke Expression in neuronalen Geweben auf, wird jedoch auch in peripheren Geweben exprimiert. TREK-1 trägt in Neuronen zur Regulation des Ruhemembranpotentials und der Erregungsleitung bei. Da das Kohlenmonoxid (CO) als TREK-1 aktivierendes Gas bekannt ist (Dallas, Scragg & Peers, 2008, Koschinsky, 2010), das im Körper ausschließlich von der Hämoxygenase produziert wird, und die HO-2 bereits als Interaktionspartner von TREK-1 identifiziert wurde, war es Ziel dieser Arbeit das Enzym HO-1 als einen möglichen Interaktionspartner für TREK-1 und weitere K_{2P} -Kanäle zu untersuchen.

4.1 Untersuchung der Interaktion von HO-1 und HO-2 mit K_{2P} -Kanälen

4.1.1 Direkte Interaktion von Hämoxygenasen mit K_{2P} -Kanälen

Das Enzym Hämoxygenase spielt die Schlüsselrolle bei der Regulation des intrazellulären Hämlevels und ist das einzige Enzym, das CO endogen produziert. Die HO-1 wird in den peripheren Geweben wie Leber, Milz und im Endothel bei Bedarf rasch hochreguliert, ist also im Gegensatz zur HO-2 induzierbar und reagiert damit auf oxidativen Stress und andere Belastungen (Koizumi, 2007). Da die HO-1 auch in neuronalem Gewebe exprimiert wird, hier jedoch weniger als die HO-2, ist eine physiologische Interaktion mit TREK-1 also auf Grund von gleicher Lokalisation möglich. In unseren Untersuchungen zur direkten Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden die Spleißvarianten TREK-1a, TREK-1b und TREK-1c mit der HO-1 untersucht. Es konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen den TREK-1 Spleißvarianten und HO-1 nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde die direkte Interaktion der TREK-1 Spleißvarianten mit HO-2 im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet. Um zu überprüfen, ob weitere K_{2P} -Kanäle wie TREK-2c und TASK-1 mit HO-1 und HO-2 direkt interagieren, wurden diese ebenfalls mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. Auch dabei konnte

eine direkte Interaktion zwischen den weiteren K_{2P} -Kanälen und HO-1 nicht nachgewiesen werden, wobei sich die direkte Interaktion zwischen TREK-2c und TASK-1 mit HO-2 erneut bestätigte (Koschinsky, 2010). Der K^+ -Kanal Kir2.1, der nicht zu der Gruppe der K_{2P} -Kanäle gezählt wird, wurde ebenfalls auf die direkte Interaktion mit HO-1 hin getestet. Aber auch bei dieser Untersuchung konnte eine direkte Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht gezeigt werden. Interessanterweise konnte auch keine Interaktion von Kir2.1 mit HO-2 im Hefe-Zwei-Hybrid-System nachgewiesen werden. Die Interaktion der HO-2 scheint demnach spezifisch für einige Mitglieder der K_{2P} -Kanäle zu sein.

Trotz der 45%igen Homologie und 76%igen Similarität zwischen HO-1 und HO-2 auf Ebene der Aminosäuresequenzen fällt im Vergleich auf, dass sich beide z. B. stark in ihren distalen Carboxytermini unterscheiden und nur HO-2 hämregulatorische Motive besitzt (siehe Abb.1.6) (Bianchetti, Yi, Ragsdale & Phillips, 2007). Diese unterschiedlichen oder fehlenden Regionen in HO-1 könnten der Grund für die fehlende Interaktion mit TREK-1 sein. Andererseits könnten der distale Carboxyterminus und die hämregulatorischen Motive der HO-2 für die Interaktion mit TREK-1 von Bedeutung sein.

Obwohl beide Enzyme dieselbe Reaktion katalysieren und beide eine antioxidative Wirkung haben, scheinen sie sich dennoch in Ihren Funktionen zu unterscheiden. Diese Tatsache spiegelt sich auch in der diversen Verteilung der Enzym-Isoformen im menschlichen Organismus wider: Während die HO-2 sehr stark im Gehirn, den Hoden und im Glomus caroticum exprimiert wird, findet man die HO-1 hauptsächlich in der Milz, dort wo gealterte Erythrozyten abgebaut werden (Kinobe, Dercho & Nakatsu, 2008; Scholtes, 2006). Der HO-1 scheint durch ihre starke Expression in der Milz eine wichtige Rolle beim Erythrozytenabbau zu zukommen. Die HO-2 ist hingegen stark im Glomus caroticum exprimiert. Hier verläuft die Enzymreaktion O_2 abhängig, wofür die beiden C-terminalen hämregulatorischen Motive der HO-2 von Bedeutung sind (Yi et al., 2009). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen beiden ist die Induzierbarkeit der HO-1. Während die HO-2 konstitutiv exprimiert wird, wird die HO-1 von einer Vielzahl an Stimuli z. B. durch Häm, Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide sowie durch Hitzeschock, schwere Blutungen und Ischämie hochreguliert (Chen-

Roetling, Benvenisti-Zarom & Regan, 2005). Diese strukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen HO-1 und HO-2 könnten auch erklären, warum bei der in dieser Arbeit angewandten Methode des „Split Ubiquitin Hefe-zwei-Hybrid-Systems für Membranproteine“ die HO-1 nicht direkt mit TREK-1 interagiert.

4.1.2 Untersuchung zur funktionellen Interaktion zwischen TREK-1c und den Isoformen HO-1 und HO-2

Die Untersuchungen zur funktionellen Auswirkung der Interaktion zwischen TREK-1c und HO-1 haben gezeigt, dass nach der Coexpression des Kanals mit dem Enzym keine signifikante Erhöhung der TREK-1c Stromamplitude in *Xenopus laevis* Oozyten auftritt. Im Gegensatz dazu wurde durch eine Coexpression der HO-2 die Stromamplitude des TREK-1c signifikant um 20 % erhöht (siehe Abb. 3.4 b). Diese Ergebnisse waren in zahlreichen Untersuchungen reproduzierbar. Bei der Versuchsdurchführung wurde darauf geachtet, dass die gleichen cRNA-Mengenverhältnisse von TREK-1c und den Hämoxygenasen zum Einsatz kamen wie bei den kürzlich beschriebenen Coexpressionen von TREK-1 und HO-2 (Koschinsky, 2010). Das cRNA-Mengenverhältnis 1:8 für TREK-1c und HO-2 ergab dort die größte Zunahme der Stromamplitude bei einer Spannung von 0 mV.

Die HO-1 scheint somit im Gegensatz zu der HO-2 keine funktionellen Auswirkungen auf den K_{2P}-Kanal TREK-1c zu haben.

Es wurde kürzlich beschrieben, dass die HO-2 ein plasmamembran-assoziiertes Protein ist (Lahiri et al., 2006). Durch die direkte Interaktion von HO-2 mit TREK-1 könnte die lokale CO-Konzentration ansteigen und diese wiederum einen aktivierenden Einfluss auf den Ionenkanal haben, der sich in einer Zunahme der Stromamplitude zeigt. Die Aktivierung des TREK-1 Kanals hat wiederum eine stabilisierende Wirkung auf das Membranpotential der Zellen.

Im Unterschied dazu scheint HO-1 weder direkt noch funktionell mit TREK-1c zu interagieren. Durch die fehlende direkte Interaktion kann es auch keinen lokalen CO-Effekt und damit auch keine funktionelle Auswirkung auf den TREK-1c geben.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu den unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften und Einflüssen der Hämoxxygenasen werden durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, welche mit HO-1-Knock-out-Mäusen gearbeitet haben, gestärkt: Die Arbeiten von Poss und Tonegawa, sowie Yet und Mitarbeitern untersuchten die Auswirkungen der fehlenden HO-1 an Knock-out Mäusen. Hierbei wurden zahlreiche pathologische Veränderungen der Mäuse wie zum Beispiel Eisenmangelanämie und chronische Entzündungsanfälligkeit festgestellt (Poss & Tonegawa, 1997a, 1997b; Yet et al., 1999). Es zeigt sich, dass das Fehlen der HO-1 nicht einfach durch die HO-2 kompensiert werden kann. Darüber hinaus scheinen beide Isoformen unterschiedliche Einflüsse auf diverse Stoffwechselwege zu haben.

Bereits 1999 beschrieben Yachie und Mitarbeiter erstmals den Fall eines jungen Patienten, welcher unter dem vollkommenen Mangel an HO-1 litt (Yachie et al., 1999). Die Auswirkungen der fehlenden HO-1, wie zunehmende Anämie, Hämolyse, chronische Entzündungen, Hepatomegalie, verzögertes Wachstum und die Nichtanlage der Milz, ähnelten den bereits an den Knock-out-Mäusen beobachteten Symptomen. Bei dem jungen Patienten war die HO-2 zwar in physiologischer Form konstitutiv exprimiert, sie war jedoch nicht in der Lage vor Häm-induzierter Zellschädigung zu schützen (Yachie et al., 1999). Auch diese Publikation lässt den Schluss zu, dass die beiden Isoformen der Hämoxxygenase trotz hoher Similarität unterschiedliche funktionelle Einflüsse haben und sich daher nicht gegenseitig ersetzen können.

4.2 Fusion des Hämagglutinin (HA)-Epitops und des EGFP-Proteins mit hTREK-1c

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von TREK-1 Fusionskonstrukten, die in immunochemischen und -histologischen Untersuchungen eine hohe Spezifität haben. Dazu wurde zunächst das HA-Epitop erfolgreich aminoterminal an TREK-1 angefügt. Die immunochemische Anfärbung im Westernblot (Abb. 3.6) zeigt eine spezifische Anfärbung des Fusionsproteins bei einem Molekulargewicht von 48 kDa. Dieses neue Fusionsprotein, hTREK-1c-EGFP, kann in nachfolgenden Untersuchungen wie

z. B. Immunpräzipitationen oder immunhistochemische Nachweise eingesetzt werden.

Dann wurde EGFP carboxyterminal im korrekten Leserahmen an TREK-1c fusioniert. Die aminoterminal fusionierte Variante war in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden. Westernblot-Analysen beider EGFP-Fusionsproteine zeigten, dass nur die Variante TREK-1c-EGFP ct durch die GFP-Antikörper spezifisch detektiert werden konnte. Auch dieses Konstrukt kann in weiteren Untersuchungen zu TREK-1 verwendet werden. Ein Grund für den fehlenden immunologischen Nachweis des EGFP-rTREK-1a Konstrukts kann in einer Fehlfaltung dieses Fusionsproteins liegen, bei der die Epitope des aminoterminal fusionierten EGFP nicht zugänglich sind und dadurch die GFP-Antikörper nicht binden können.

Die beiden an TREK-1 angehängten Fremdsequenzen, HA-Epitop und EGFP, sind strukturell sehr unterschiedlich. Das HA-Epitop ist sehr klein und besteht nur aus 9 Aminosäuren. Bei einem solch kurzen Peptid wird eine funktionelle Störung des Ionenkanals (z. B. im intrazellulären Transport oder seiner Ionenkanalleitfähigkeit) nicht unbedingt erwartet, muss aber trotzdem vor der Durchführung weiterer Experimente ausgeschlossen werden. Bei einem Protein wie EGFP mit einem MWG von 26,9 kDa ist schon eher denkbar, dass das fusionierte Protein durch seine räumliche Größe den Ionenkanal funktionell stören kann. Da der Carboxyterminus des TREK-1 bei der Regulation und bei zahlreichen Protein-Proteininteraktionen eine wichtige Rolle spielt (siehe Kapitel 1.3.1-1.3.2), muss auch bei diesem Konstrukt, vor der Durchführung weiterer Experimente, eine Beeinflussung der Ionenkanaleigenschaften durch die carboxyterminale Fusion von EGFP ausgeschlossen werden.

4.3 Ausblick

Mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ist es möglich Rückschlüsse auf die Interaktion des TREK-1 mit HO-2 zu ziehen. Die Erkenntnis, dass HO-1 im Unterschied zu HO-2 nicht mit TREK-1 funktionell interagiert, zusammen mit den im Homologievergleich auftretenden strukturellen Unterschieden zwischen HO-2 und HO-1 (siehe Abbildung 1.6), führen zu neuen Untersuchungsansätzen. Interessant wäre eine Untersuchung zu den stark unterschiedlichen distalen Carboxytermini der beiden Hämoxygenasen, bzw. zu den nur in HO-2 vorliegenden hämregulatorischen Motiven. In einem neuen Versuchsansatz könnten die distalen Carboxytermini von HO-1 und HO-2 ausgetauscht werden. Es entstünden dann die neuen rekombinanten Formen HO-1-CT-HO-2 (HO-1 mit dem distalen Carboxyterminus von HO-2) und HO-2-CT-HO-1 (HO-2 mit dem distalen Carboxyterminus von HO-1), die im direkten Interaktionsexperiment mit TREK-1 untersucht werden könnten. Sollte das Konstrukt HO-1-CT-HO-2 direkt mit TREK-1 interagieren und das Konstrukt HO-2-CT-HO-1 nicht, wäre die Beteiligung des distalen Carboxyterminus der HO-2 an der Interaktion bestätigt. Auch Verkürzungs- und Deletionsmutanten (z. B. Deletion der hämregulatorischen Motive) von HO-2 könnten zur weiteren Aufklärung der Interaktionsregion untersucht werden.

Mit den neu hergestellten TREK-1-Fusionsproteinen könnte durch Coimmunopräzipitation ein weiterer Nachweis erbracht werden, dass TREK-1 und HO-2 interagieren. Das würde die Arbeitshypothese unterstützen, dass der lokale Konzentrationsanstieg von CO zu einer Aktivierung des TREK-1 führt. Zunächst muss jedoch überprüft werden, dass sich die Leitfähigkeit bzw. der intrazelluläre Transport des Ionenkanals durch die angefügten Epitope nicht verändert.

Weiterhin wäre es interessant, mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme zu untersuchen, ob nach Coexpression von TREK-1 mit HO-2 in Oozyten eine zusätzliche Injektion der Hämoxygenase-Substrate Häm und/oder NADPH (siehe Abbildung 1.5) eine weitere Erhöhung der Stromamplitude bewirken könnte. Sollte in den Oozyten ein Mangel an Hämoxygenase-Substraten auftreten, könnte das die CO-Produktion der

Hämoxygenase-Enzymreaktion limitieren und damit den Grad der TREK-1-Aktivierung einschränken.

Die bisherigen Untersuchungen fokussierten sich im Hinblick auf die Protein-Protein-Interaktion immer auf die Folgen für den Kanal. Es stellt sich die Frage, ob die Interaktion mit TREK-1 nicht auch funktionelle Auswirkungen auf HO-2 hat. Denkbar wäre, dass durch die Interaktion die Enzymkinetik der HO-2 verändert wird oder dass an der von TREK-1 besetzten Interaktionsregion andere Interaktionspartner von HO-2 nicht mehr in der Lage sind zu binden. HO-2 könnte durch die Interaktion mit TREK-1 dann stärker an die Plasmamembran transportiert werden, weil eventuell ein anderes Protein, das die HO-2 zurückhalten würde, nicht mehr binden kann. Dazu könnten Untersuchungen zur subzellulären Colokalisation von HO-2 und TREK-1 durchgeführt werden, um zu erfahren, in welchem Ausmaß die HO-2 an der Plasmamembran lokalisiert ist, wenn TREK-1 coexprimiert wird. Hierbei könnten die neuen TREK-1-Fusionsproteine ebenfalls Einsatz finden.

5. Zusammenfassung

Einleitung

Der mechanosensitive K_{2P} -Kanal TREK-1 ist stark in neuronalem Gewebe exprimiert und wird durch verschiedene chemische und physikalische Stimuli und einige Interaktionspartner reguliert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass TREK-1 an pathophysiologischen Prozessen wie Neuroprotektion, Schmerz und Depression beteiligt ist. TREK-1-Kanäle können das Ruhemembranpotential von Neuronen stabilisieren und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Membranerregbarkeit.

Ziel dieser Arbeit war es, die direkte Interaktion der induzierbaren HO-1 und der konstitutiv exprimierten HO-2 mit TREK-1 zu vergleichen und Aminosäureregionen zu identifizieren, die für die Interaktion wichtig sind.

Material und Methoden

Um die direkte Interaktion von TREK-1 mit HO-1 und HO-2 zu testen, wurde das Split-Ubiquitin Hefe Zwei-Hybrid-System zur Untersuchung von Membranproteinen verwendet. Dieses System nutzt die funktionelle Zusammenlagerung der beiden separierbaren Domänen des Ubiquitins, um Proteininteraktionen zu untersuchen. Die C-terminale Hälfte des Ubiquitins (Cub), an das ein artifizieller Transkriptionsfaktorkomplex gebunden ist, wurde an TREK-1 (Bait) fusioniert und die N-terminale Hälfte des Ubiquitins (NubG) wurde an HO-1 und HO-2 (Prey) fusioniert. Die Interaktion zwischen den Bait und Prey Proteinen bringt beide Ubiquitinhälften Cub und NubG zusammen, wodurch der Transkriptionsfaktorkomplex freigesetzt wird, in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Reportergenen aktiviert. Die Hefezellen sind dann befähigt auf einem histidinfreien Selektionsmedium zu wachsen und beim β -Galaktosidase-Assay eine Blaufärbung zu ergeben.

Um die physiologische Relevanz der Interaktion von TREK-1 mit HO-1 und HO-2 zu untersuchen, wurden das Kanalprotein und die beiden Hämoxxygenasen in *Xenopus laevis* Oozyten coexprimiert und die TREK-1-Ströme mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen.

Zur Herstellung von TREK-1-Konstrukten, die spezifische antigene Epitope enthalten, wurden das HA-Epitop (N-terminal) und das EGFP (C-terminal) mit

Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese mit TREK-1 fusioniert. Anschließend wurden die Fusionskonstrukte durch Westernblot-Analysen immunochemisch charakterisiert.

Ergebnisse

Es konnten spezifische und starke Interaktionen zwischen verschiedenen K_{2P} -Kanälen (TREK-1, TREK-2c und TASK-1) und HO-2 mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Methode gezeigt werden, die für den nahen Verwandten HO-1 nicht nachweisbar waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass weder HO-2 noch HO-1 mit dem einwärtsgerichtenden Kaliumkanal Kir2.1 interagieren. Die physiologische Relevanz der Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2 konnte durch Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gezeigt werden, bei denen es nach Coexpression beider Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten zu einer signifikanten Erhöhung des Ionenkanalstroms kam. Im Gegensatz dazu führte die Coexpression von TREK-1 und HO-1 zu keinen signifikanten Änderungen der Ionenkanalströme.

Diskussion

Von beiden untersuchten Hämoxxygenasen konnte nur HO-2 als ein spezifischer Interaktionspartner für TREK-1 und andere K_{2P} -Kanäle nachgewiesen werden. Funktionell wirkt sich die Interaktion zwischen TREK-1 und HO-2 in einer Zunahme des Ionenkanalstroms aus, wodurch das Membranpotential von Zellen, in denen beide Proteinpartner exprimiert werden, stabilisiert werden könnte. Obwohl HO-1 und HO-2 auf Ebene der Aminosäuresequenzen eine hohe Similarität (76 %) haben, zeigen sich einige strukturelle Unterschiede, vor allem in den distalen C-Termini und bei den hämregulatorischen Motiven der HO-2. Diese strukturellen Unterschiede könnten zum einen für die fehlende Interaktion von HO-1 und TREK-1 verantwortlich sein und zum anderen für die spezifische Interaktion von HO-2 und TREK-1 wichtig sein. Weitere Untersuchungen von speziellen HO-2 Deletionsmutanten und der Austausch der distalen C-Termini zwischen HO-2 und HO-1 könnten Aufschluss über die Wichtigkeit dieser Regionen bei der Interaktion mit TREK-1 geben. Experimente mit den TREK-1 Fusionskonstrukten könnten bei weiteren immunochemischen Charakterisierungen hilfreich sein.

6. Summary

Introduction

The mechanosensitive K_{2P}-channel TREK-1 is expressed at high levels in the nervous system and is regulated by diverse physical and chemical stimuli and interaction partners. Several *in vivo* studies have demonstrated that TREK-1 is involved in pathophysiological processes like neuroprotection, pain and depression. TREK-1 channels stabilize the resting membrane potential of neurons and consequently have a key role in the regulation of membrane excitability. The aim of this study was to compare the direct interaction of the inducible enzyme heme oxygenase 1 (HO-1) and the constitutively expressed heme oxygenase 2 (HO-2) with TREK-1 and to identify amino acid regions responsible for the interaction.

Material and Methods

To characterize the direct interaction of TREK-1 with HO-1 und HO-2, the split-ubiquitin yeast two-hybrid system was used, which is specialized for membrane proteins. This method utilizes complementation between separable domains of ubiquitin to study protein interactions. The C-terminal half of ubiquitin (Cub), along with an artificial transcription factor complex was fused to TREK-1 (bait) and the N-terminal half of ubiquitin (NubG) was fused to HO-1 or HO-2 (preys). Interaction between bait and prey proteins brings Cub and NubG together which activates the transcription factor complex. This complex enters the nucleus and activates the expression of several reporter genes which in turn enable the yeast cells to grow on a selective medium lacking histidine and turn blue in a β -galactosidase assay.

To investigate the physiological relevance of the interaction of TREK-1 with HO-1 and HO-2 the channel and the two heme oxygenase isoforms were co-expressed in *Xenopus laevis* oocytes and the TREK-1 currents were measured with the two-electrode voltage-clamp method.

In order to produce TREK-1 constructs with specific antigenic epitopes the HA-epitope (N-terminally) and the EGFP (C-terminally) were fused to the TREK-1

by using the site-directed mutagenesis method. Subsequently the fusion constructs were characterized with the Westernblot technique.

Results

Specific and strong interactions between several K_{2P} -channels (TREK-1, TREK-2c and TASK-1) and HO-2 but not with its closely related isoform HO-1 could be demonstrated using a yeast two-hybrid direct interaction study. Additionally, it could also been shown that neither HO-2 nor HO-1 interacted with the inwardly rectifying potassium channel Kir2.1. Furthermore, physiological significance of the interaction between TREK-1 and HO-2 was demonstrated by two-electrode voltage-clamp measurements showing an increase in channel currents following the co-expression of TREK-1 and HO-2 in *Xenopus laevis* oocytes. On the contrary, co-expression of TREK-1 with HO-1 did not yield any changes in the channel currents.

Discussion

From the two studied heme oxygenases only HO-2 could be identified as a specific interaction partner of TREK-1 and other K_{2P} -channels. Functionally, the interaction between TREK-1 and HO-2 leads to an increase of the channel currents, which in turn stabilizes the membrane potential of the cells in which both proteins are expressed. Although HO-1 and HO-2 have a high similarity (76 %) in their amino acid sequences, they exhibit several structural differences especially in the distal C-termini and the heme regulatory motifs of HO-2. These structural differences could be responsible for the absence of interaction between HO-1 and TREK-1 and in contrary be important for the specific interaction between HO-2 and TREK-1. Further analysis of defined HO-2 deletion mutants and the exchange of the distal C-termini between HO-2 and HO-1 could give more information about the importance of these regions for their interaction with TREK-1. Designing more experiments with the TREK-1 fusion constructs could be helpful for carrying out further immunochemical studies.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Adelman, J. P., Bond, C. T., Pessia, M., & Maylie, J. (1995). Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions. *Neuron*, 15(6), 1449-1454.
- Azzalin, A., Ferrara, V., Arias, A., Cerri, S., Avella, D., Pisu, M. B., et al. (2006). Interaction between the cellular prion (PrPC) and the 2P domain K⁺ channel TREK-1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(1), 108-115.
- Bai, X., Bugg, G. J., Greenwood, S. L., Glazier, J. D., Sibley, C. P., Baker, P. N., et al. (2005). Expression of TASK and TREK, two-pore domain K⁺ channels, in human myometrium. *Reproduction*, 129(4), 525-530.
- Balla, G., Jacob, H. S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., et al. (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*, 267(25), 18148-18153.
- Bauer, M., & Bauer, I. (2002). Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 4(5), 749-758.
- Bianchetti, C. M., Yi, L., Ragsdale, S. W., & Phillips, G. N., Jr. (2007). Comparison of apo- and heme-bound crystal structures of a truncated human heme oxygenase-2. *J Biol Chem*, 282(52), 37624-37631.
- Bockenhauer, D., Zilberberg, N., & Goldstein, S. A. (2001). KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nat Neurosci*, 4(5), 486-491.
- Buckler, K. J., & Honore, E. (2005). The lipid-activated two-pore domain K⁺ channel TREK-1 is resistant to hypoxia: implication for ischaemic neuroprotection. *J Physiol*, 562(Pt 1), 213-222.
- Burger, D., Xiang, F., Hammoud, L., Lu, X., & Feng, Q. (2009). Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296(1), H84-93.
- Caley, A. J., Gruss, M., & Franks, N. P. (2005). The effects of hypoxia on the modulation of human TREK-1 potassium channels. *J Physiol*, 562(Pt 1), 205-212.
- Chang, A. Y., Chan, J. Y., Cheng, H. L., Tsai, C. Y., & Chan, S. H. (2009). Hypoxia-inducible factor 1/heme oxygenase 1 cascade as upstream signals in the prolife role of heat shock protein 70 at rostral ventrolateral medulla during experimental brain stem death. *Shock*, 32(6), 651-658.
- Chen-Roetling, J., Benvenisti-Zarom, L., & Regan, R. F. (2005). Cultured astrocytes from heme oxygenase-1 knockout mice are more vulnerable to heme-mediated oxidative injury. *J Neurosci Res*, 82(6), 802-810.
- Choe, S. (2002). Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci*, 3(2), 115-121.
- Dallas, M. L., Boyle, J. P., Milligan, C. J., Sayer, R., Kerrigan, T. L., McKinstry, C., et al. (2011). Carbon monoxide protects against oxidant-induced apoptosis via inhibition of Kv2.1. *FASEB J*, 25(5), 1519-1530.
- Dallas, M. L., Scragg, J. L., & Peers, C. (2008). Modulation of hTREK-1 by carbon monoxide. *Neuroreport*, 19(3), 345-348.
- Dedman, A., Sharif-Naeini, R., Folgering, J. H., Duprat, F., Patel, A., & Honore, E. (2009). The mechano-gated K(2P) channel TREK-1. *Eur Biophys J*, 38(3), 293-303.

- Dennerly, P. A., McDonagh, A. F., Spitz, D. R., Rodgers, P. A., & Stevenson, D. K. (1995). Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med*, 19(4), 395-404.
- Donovan, A., & Andrews, N. C. (2004). The molecular regulation of iron metabolism. *Hematol J*, 5(5), 373-380.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., et al. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Elbirt, K. K., & Bonkovsky, H. L. (1999). Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(5), 438-447.
- Fagone, P., Mangano, K., Coco, M., Perciavalle, V., Garotta, G., Romao, C. C., et al. (2012). Therapeutic potential of carbon monoxide in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*, 167(2), 179-187.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., et al. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J*, 15(24), 6854-6862.
- Franks, N. P., & Honore, E. (2004). The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 25(11), 601-608.
- Froese, A., Breher, S. S., Waldeyer, C., Schindler, R. F., Nikolaev, V. O., Rinne, S., et al. (2012). Popeye domain containing proteins are essential for stress-mediated modulation of cardiac pacemaking in mice. *J Clin Invest*, 122(3), 1119-1130.
- Furchgott, R. F., & Jothianandan, D. (1991). Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*, 28(1-3), 52-61.
- Goldstein, S. A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I., & Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci*, 2(3), 175-184.
- Hayashi, S., Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hara, T., Sagara, Y., et al. (2004). Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336(2), 241-250.
- Honore, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci*, 8(4), 251-261.
- Honore, E., Maingret, F., Lazdunski, M., & Patel, A. J. (2002). An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. *EMBO J*, 21(12), 2968-2976.
- Hosick, P. A., & Stec, D. E. (2012). Heme oxygenase, a novel target for the treatment of hypertension and obesity? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(2), R207-214.
- Kim, E., Hwang, E. M., Yarishkin, O., Yoo, J. C., Kim, D., Park, N., et al. (2010). Enhancement of TREK1 channel surface expression by protein-protein interaction with beta-COP. *Biochem Biophys Res Commun*, 395(2), 244-250.
- Kim, H. P., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2006). CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 411-449.
- Kinobe, R. T., Dercho, R. A., & Nakatsu, K. (2008). Inhibitors of the heme oxygenase - carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic? *Can J Physiol Pharmacol*, 86(9), 577-599.
- Klinke. (2009). Physiologie. 6. Aufl., vollst. überarb. 2009 944 S., 825 Abb., geb.

- Koh, S. D., Monaghan, K., Sergeant, G. P., Ro, S., Walker, R. L., Sanders, K. M., et al. (2001). TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. *J Biol Chem*, 276(47), 44338-44346.
- Koizumi, S. (2007). Human heme oxygenase-1 deficiency: a lesson on serendipity in the discovery of the novel disease. *Pediatr Int*, 49(2), 125-132.
- Koschinsky, K. (2010). Diplomarbeit, Charakterisierung von Interaktionspartnern des humanen K2P-Kanals TREK-1. *Marburg an der Lahn*.
- Lahiri, S., Roy, A., Baby, S. M., Hoshi, T., Semenza, G. L., & Prabhakar, N. R. (2006). Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol*, 91(3), 249-286.
- Lesage, F. (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology*, 44(1), 1-7.
- Lesage, F., & Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279(5), F793-801.
- Maines, M. D. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*, 2(10), 2557-2568.
- Maines, M. D. (2005). The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid Redox Signal*, 7(11-12), 1761-1766.
- Maines, M. D., Trakshel, G. M., & Kutty, R. K. (1986). Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*, 261(1), 411-419.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., et al. (2000). TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J*, 19(11), 2483-2491.
- Mathie, A., & Veale, E. L. (2007). Therapeutic potential of neuronal two-pore domain potassium-channel modulators. *Curr Opin Investig Drugs*, 8(7), 555-562.
- McCoubrey, W. K., Jr., Huang, T. J., & Maines, M. D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem*, 247(2), 725-732.
- Medhurst, A. D., Rennie, G., Chapman, C. G., Meadows, H., Duckworth, M. D., Kelsell, R. E., et al. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res*, 86(1-2), 101-114.
- Miller, P., Kemp, P. J., & Peers, C. (2005). Structural requirements for O₂ sensing by the human tandem-P domain channel, hTREK1. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(4), 1253-1256.
- Moha ou Maati, H., Peyronnet, R., Devader, C., Veyssiere, J., Labbal, F., Gandin, C., et al. (2011). A human TREK-1/HEK cell line: a highly efficient screening tool for drug development in neurological diseases. *PLoS One*, 6(10), e25602.
- Moha Ou Maati, H., Veyssiere, J., Labbal, F., Coppola, T., Gandin, C., Widmann, C., et al. (2012). Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology*, 62(1), 278-288.
- Murbartian, J., Lei, Q., Sando, J. J., & Bayliss, D. A. (2005). Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem*, 280(34), 30175-30184.
- Nickel, W., Malsam, J., Gorgas, K., Ravazzola, M., Jenne, N., Helms, J. B., et al. (1998). Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci*, 111 (Pt 20), 3081-3090.
- Okwundu, C. I., Okoromah, C. A., & Shah, P. S. (2012). Prophylactic phototherapy for preventing jaundice in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD007966.

- Otterbein, L. E., & Choi, A. M. (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(6), L1029-1037.
- Otterbein, L. E., Hedblom, A., Harris, C., Csizmadia, E., Gallo, D., & Wegiel, B. (2011). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide modulate DNA repair through ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(35), 14491-14496.
- Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R., & Immenschuh, S. (2010). Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*, 80(12), 1895-1903.
- Patel, A. J., & Honore, E. (2001). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci*, 24(6), 339-346.
- Patel, A. J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., et al. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J*, 17(15), 4283-4290.
- Peers, C. (2011). Ion channels as target effectors for carbon monoxide. *Exp Physiol*, 96(9), 836-839.
- Peers, C., & Steele, D. S. (2012). Carbon monoxide: a vital signalling molecule and potent toxin in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 52(2), 359-365.
- Poss, K. D., & Tonegawa, S. (1997a). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20), 10919-10924.
- Poss, K. D., & Tonegawa, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(20), 10925-10930.
- Rajan, S., Preisig-Muller, R., Wischmeyer, E., Nehring, R., Hanley, P. J., Renigunta, V., et al. (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J Physiol*, 545(Pt 1), 13-26.
- Rinné, S. (2008). Molekulare Mechanismen der Regulation des Kaliumkanals TREK-1. *Dissertation, Marburg an der Lahn*.
- Sandoz, G., & Lesage, F. (2008). Protein complex analysis of native brain potassium channels by proteomics. *Methods Mol Biol*, 491, 113-123.
- Sandoz, G., Tardy, M. P., Thummler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., & Lesage, F. (2008). Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *J Neurosci*, 28(34), 8545-8552.
- Sandoz, G., Thummler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., et al. (2006). AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J*, 25(24), 5864-5872.
- Schmidt, R., Hoetzel, A., Baechle, T., Loop, T., Humar, M., Bauer, M., et al. (2004). Isoflurane pretreatment lowers portal venous resistance by increasing hepatic heme oxygenase activity in the rat liver in vivo. *J Hepatol*, 41(5), 706-713.
- Scholtes, M. (2006). Einfluss der induzierbaren Hämoxygenase (HO-1) auf die Mikrozirkulation bei der Postischämie-Pankreatitis. *Dissertation, Freiburg i.Br.*
- Schwingshackl, A., Teng, B., Ghosh, M., West, A. N., Makena, P., Gorantla, V., et al. (2012). Regulation and function of the two-pore-domain (K2P) potassium channel Trek-1 in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302(1), L93-L102.
- Slebos, D. J., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2003). Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respir Res*, 4, 7.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., & Ames, B. N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235(4792), 1043-1046.

- Sugishima, M., Hagiwara, Y., Zhang, X., Yoshida, T., Migita, C. T., & Fukuyama, K. (2005). Crystal structure of dimeric heme oxygenase-2 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in complex with heme. *Biochemistry*, 44(11), 4257-4266.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61(2), 748-755.
- Tenhunen, R., Marver, H. S., & Schmid, R. (1969). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*, 244(23), 6388-6394.
- Thomas, D., Plant, L. D., Wilkens, C. M., McCrossan, Z. A., & Goldstein, S. A. (2008). Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron*, 58(6), 859-870.
- Tristani-Firouzi, M., & Etheridge, S. P. (2010). Kir 2.1 channelopathies: the Andersen-Tawil syndrome. *Pflugers Arch*, 460(2), 289-294.
- Tullius, S. G., Nieminen-Kelha, M., Buelow, R., Reutzel-Selke, A., Martins, P. N., Pratschke, J., et al. (2002). Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation*, 74(5), 591-598.
- Umeda, K., Takahashi, T., Inoue, K., Shimizu, H., Maeda, S., Morimatsu, H., et al. (2009). Prevention of hemorrhagic shock-induced intestinal tissue injury by glutamine via heme oxygenase-1 induction. *Shock*, 31(1), 40-49.
- Vallee, N., Meckler, C., Risso, J. J., & Blatteau, J. E. (2012). Neuroprotective role of the TREK-1 channel in decompression sickness. *J Appl Physiol*.
- Veale, E. L., Rees, K. A., Mathie, A., & Trapp, S. (2010). Dominant negative effects of a non-conducting TREK1 splice variant expressed in brain. *J Biol Chem*, 285(38), 29295-29304.
- Wagener, F. A., Volk, H. D., Willis, D., Abraham, N. G., Soares, M. P., Adema, G. J., et al. (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev*, 55(3), 551-571.
- Warnatz, H. J., Schmidt, D., Manke, T., Piccini, I., Sultan, M., Borodina, T., et al. (2011). The BTB and CNC homology 1 (BACH1) target genes are involved in the oxidative stress response and in control of the cell cycle. *J Biol Chem*, 286(26), 23521-23532.
- Williams, S. E., Wootton, P., Mason, H. S., Bould, J., Iles, D. E., Riccardi, D., et al. (2004). Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science*, 306(5704), 2093-2097.
- Wu, L., & Wang, R. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*, 57(4), 585-630.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., et al. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*, 103(1), 129-135.
- Yamamoto, Y., & Taniguchi, K. (2006). Expression of tandem P domain K⁺ channel, TREK-1, in the rat carotid body. *J Histochem Cytochem*, 54(4), 467-472.
- Yet, S. F., Perrella, M. A., Layne, M. D., Hsieh, C. M., Maemura, K., Kobzik, L., et al. (1999). Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest*, 103(8), R23-29.
- Yi, L., Jenkins, P. M., Leichert, L. I., Jakob, U., Martens, J. R., & Ragsdale, S. W. (2009). Heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 form a thiol/disulfide redox switch that responds to the cellular redox state. *J Biol Chem*, 284(31), 20556-20561.

Zhu, X., Fan, W. G., Li, D. P., Kung, H., & Lin, M. C. (2011). Heme oxygenase-1 system and gastrointestinal inflammation: a short review. *World J Gastroenterol*, 17(38), 4283-4288.

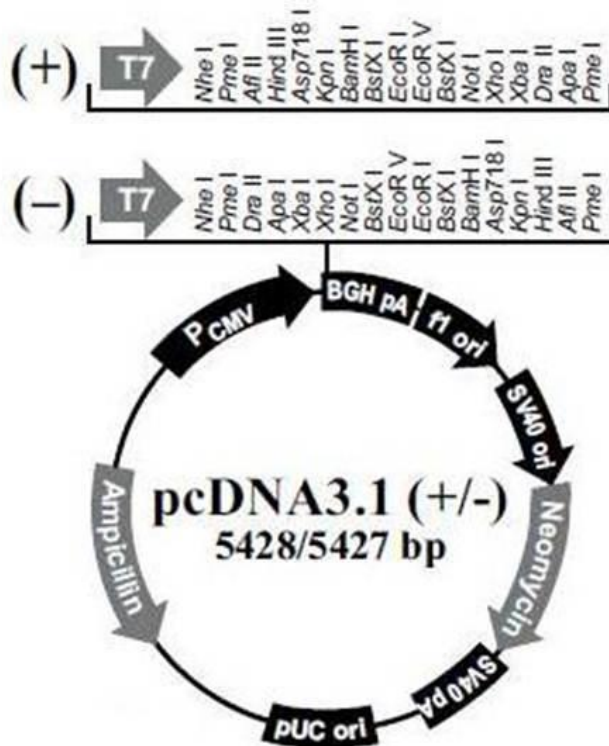
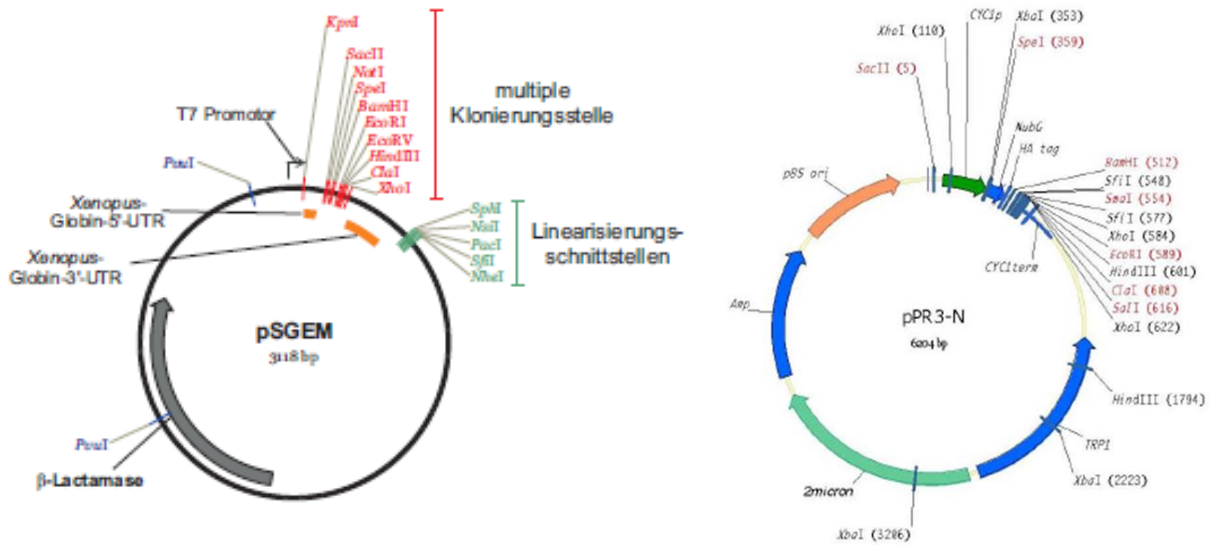
7.2 Abbildungsverzeichnis

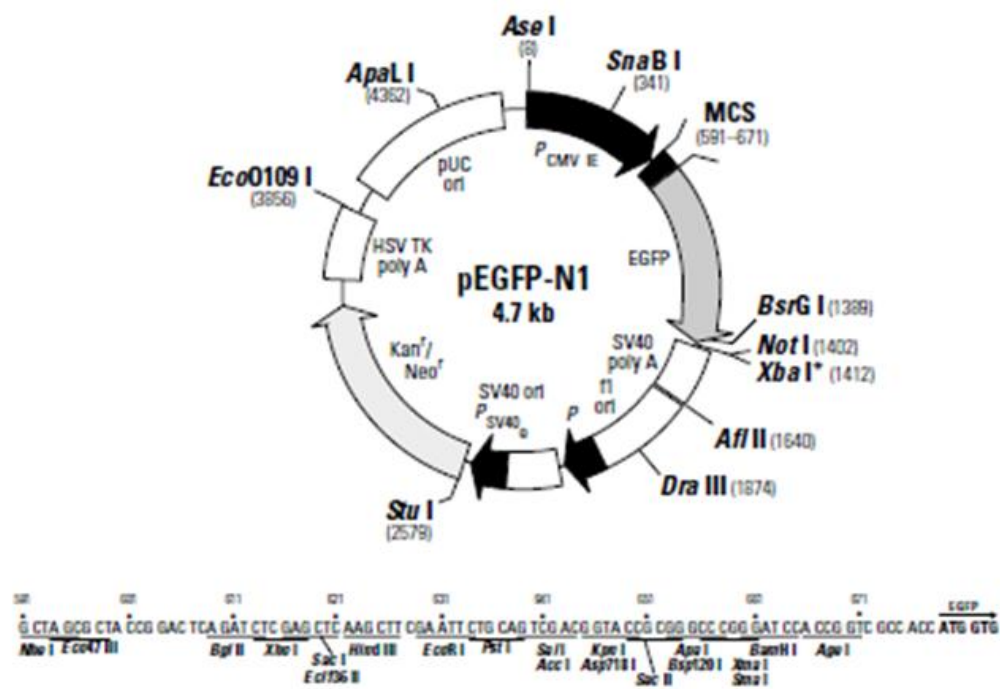
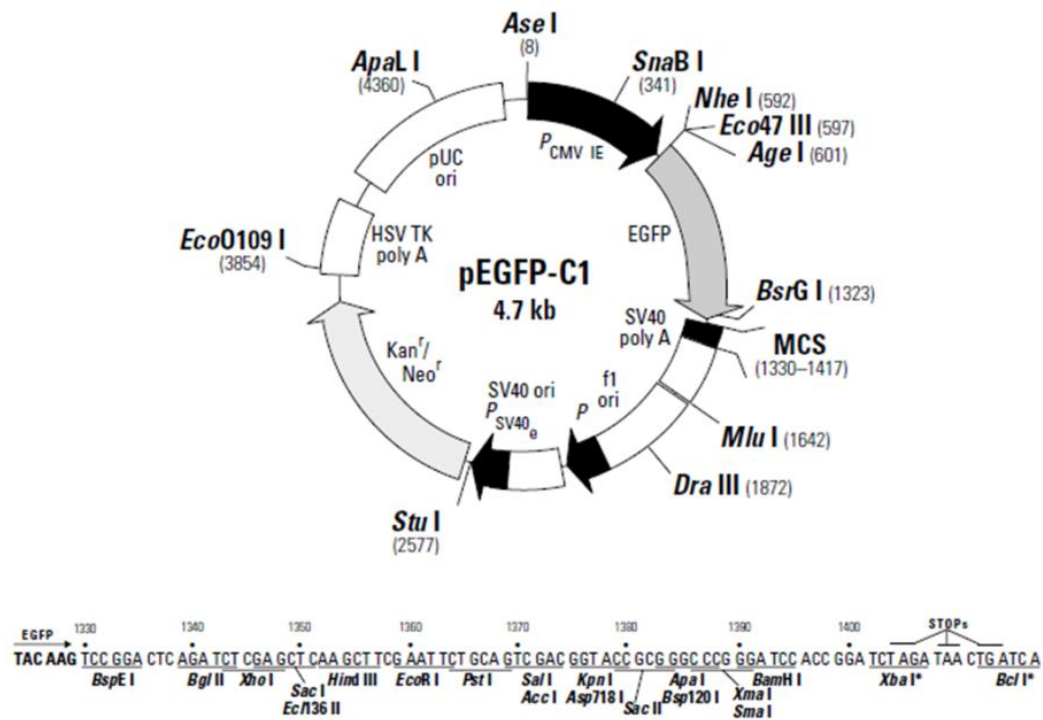
Abbildung	Bildunterschrift	Seite
Abb. 1.1	Übersicht über die drei Hauptklassen der Kaliumkanäle. [aus (Goldstein, Bockenhauer, O'Kelly, & Zilberberg, 2001)]	2
Abb. 1.2	Phylogenetischer Stammbaum der humanen K _{2P} -Kanäle. [modifiziert nach (Honore, 2007)]	4
Abb. 1.3	Schematische Darstellung von TREK-1. [modifiziert nach (Honore, 2007) und (Kim, et al., 2010)]	6
Abb. 1.4	Regulationsmechanismen des TREK-1. [nach (Honore, 2007)]	9
Abb. 1.5	Schematische Darstellung der von der Hämoxygenase katalysierten Reaktion.	14
Abb. 1.6	Sequenzvergleich von humaner Hämoxygenase-1 und Hämoxygenase-2.	18
Abb. 2.1	Spannungsprotokoll zur TEVC bei hTREK-1 Kanälen.	39
Abb. 2.2	Aufbau der Blotvorrichtung.	44
Abb. 2.3	Interaktion von Bait und Prey.	47
Abb. 3.1	Untersuchung der Interaktion von TREK-1 Spleißvarianten mit HO-1 und HO-2.	52
Abb. 3.2	Untersuchung der Interaktion weiterer K _{2P} -Kanäle mit HO-1 und HO-2.	53
Abb. 3.3	Untersuchung der Interaktion von Kir2.1 mit HO-1 und HO-2.	55
Abb. 3.4 a	Strom-Spannungs Kurve von hTREK-1c unter dem Einfluss von HO-1 und HO-2.	57
Abb. 3.4 b	TEVC-Messungen von hTREK-1c nach Coexpression mit HO-1 oder HO-2 in <i>X. laevis</i> Oozyten.	57
Abb. 3.5	Schematische Darstellung der Fusion des HA-Epitops mit hTREK-1c.	58
Abb. 3.6	Westernblot mit N-terminal in hTREK-1c eingefügtem HA-Epitop.	59
Abb. 3.7	Schematische Darstellung der Fusion des EGFP mit dem Carboxyterminus des hTREK-1c.	60
Abb. 3.8	Westernblot mit aminoterminal und carboxyterminal in TREK-1 eingefügtem EGFP.	61

7.3 Tabellenverzeichnis:

Tabelle	Bildunterschrift	Seite
Tab. 1	Darstellung der wichtigsten Funktionen und Eigenschaften der HO-Isoenzyme. [modifiziert nach (Wagener, et al., 2003)]	17

7.4 Vektorkarten





7.5 Tabellarischer Lebenslauf

Der tabellarische Lebenslauf enthält persönliche Daten.

Er ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

7.6 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Arweiler, Aumüller, Auschill, Bremmer, Czubayko, Daut, Feuser, Frankenberger, Gente, Glörfeld, Grosse, Hilt, Höffken, Jablonski-Momeni, Koolman, Korbmacher-Steiner, Lalyko, Lamp, Lill, Löffler, Lotzmann, Mandic, Mandrek, Mengel, Milani, Mittag, Moll, Neff, Neumüller, Nonnenmacher, Ohnmeiß, Pancherz, Pieper, Post, Preisig-Müller, Ramaswamy, Roggendorf, Röhm, Ruchholtz, Steininger, Stoll, Suske, Teymoortash, Weber, Weihe, Westermann.

7.7 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Daut bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Der größte Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Regina Preisig-Müller, für ihre immer freundliche und umfassende Betreuung und für ihre ständige Erreichbarkeit. Ihre Gabe die fachfremden Zusammenhänge in verständliche Worte zu fassen, hat mir sehr geholfen. Ich danke Ihr auch dafür, dass sie sich auf das Projekt während der vorlesungsfreien Zeit eingelassen hat und für die Experimente kein Freisemester von mir gefordert hat.

Frau Diplom-Humanbiologin Kristin Koschinsky danke ich für ihre Hilfe beim Injizieren, Messen und die anregenden Gespräche zu unserem Projekt. Danke für die Geduld im Labor, Westernblots, Konzentrationsberechnungen und für Vieles mehr. Ohne ihre Hilfe wäre mir die Durchführung dieser Arbeit schlichtweg unmöglich gewesen.

Herrn Dr. Vijay Renigunta danke ich für die Hilfe bei jeglichen Fragen und die Unterstützung im Labor. Mich haben die gemeinsamen Unterhaltungen stets zum Nachdenken angeregt und dadurch weitergebracht.

Vielen lieben Dank auch an Andrea Schubert, Doris Wagner, Kirsten Ramlow, Julia Schiekel und Stefan Kling für ihre Hilfe bei technischen und methodischen Fragen und für die freundlichen Wortwechsel zwischendurch. Herrn Dr. Günter Schlichthörl danke ich für die Hilfe bei der Lösung von Hard- und Softwareproblemen und beim Injizieren.

Herzlich danke ich Frau Diplom-Humanbiologin Maike Gold für das Korrekturlesen dieser Arbeit, viele hilfreiche Anregungen und für die Einführung in diese Arbeitsgruppe.

Außerdem danke ich Herrn Diplom-Humanbiologe Michael Netter für seine unmittelbare Hilfe bei der Lösung von IT-Problemen und für die unterhaltsamen Mittagspausen.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die durch Ihre großzügige Unterstützung einen nicht unerheblichen Teil zu meinem Studium und der Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Von Herzen danke ich meinem zukünftigen Mann Dr. Philipp Kocher für sein Verständnis sich nach dem Examen ganz der Doktorarbeit in Marburg zu widmen und für seine Unterstützung bei der Formatierung dieser Arbeit. In den letzten Jahren war seine Anwesenheit und Zuneigung der Grund meiner Fröhlichkeit, Zufrieden- und Gelassenheit.